

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG
ÜBER DEN EINFLUSS EINES ERHÖHTEN
CHENODESOXYCHOLSÄURE-SPIEGELS
AUF DIE DMBA-INDUZIERT E MAMMA-
CARCINOGENESE DER RATTE

Florian Leitl



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0066

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. M. Eder

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ÜBER DEN EINFLUSS EINES
ERHÖHTEN CHENODESOXYCHOLSÄURE - SPIEGELS AUF DIE
DMBA - INDUZIERTER MAMMA - CARCINOGENESE DER RATTE

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Leitl
aus
München
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Baldur Wiebecke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.5.1987

In memoriam

Dr. Gertraud Fichtner, geb. Zametzer

Ärztin für Dermatologie

18.11.1930 - 18.09.1971

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Epidemiologische Gemeinsamkeiten von Mamma-Carcinom und Colon-Carcinom.....	1
1.2. Bedeutung der Ernährungsweise für Colon- und Mamma-Carcinom-Risiko.....	3
1.3. Einflüsse der Ernährung auf die Colon- und Mamma-Carcinogenese.....	4
1.4. Gallensäuren und enterohepatischer Kreislauf.....	7
1.5. Gallensäuren und Colon-Carcinogenese.....	10
1.6. Gallensäuren und Mamma-Carcinom.....	14
1.7. Überlegungen zur Wahl des Versuchsmodells.....	16
1.8. Anatomie, Histologie und postnatale Ent- wicklung der Milchdrüse der Ratte.....	21
1.9. Fragestellungen.....	28
2. MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1. Versuchstiere: Herkunft und Haltung.....	29
2.2. Applikation des Carcinogens 7,12-Dimethyl- benz(a)anthrazen (DMBA) und der Chenodes- oxycholsäure: Bildung von Versuchs- und Kontrollgruppe.....	30
2.3. Versuchsprotokoll.....	31
2.4. Bestimmung der Gallensäurenkonzentration im peripheren Blut der Versuchstiere.....	32

	Seite
3. ERGEBNISSE.....	34
3.1. Versuchsverlauf.....	34
3.1.1. Verendete und getötete Tiere.....	34
3.1.2. Gewichtsverlauf.....	38
3.2. Mamma-Neoplasien.....	38
3.2.1. Tumorausbeute.....	38
3.2.2. Tumorinduktionszeit.....	54
3.2.3. Tumorgrößen und Tumorwachstumsgeschwindigkeit.....	56
3.2.4. Lokalisation der Mamma-Tumoren.....	60
3.2.5. Metastasierung.....	62
3.3. Extramammäre Neoplasien.....	62
3.4. Toxizität von DMBA.....	65
3.5. Gallensäuren-Konzentration und prozentuale Zusammensetzung der Gallensäuren im peri- pheren venösen Blut.....	67
4. DISKUSSION.....	70
4.1. Chenodesoxycholsäureverfütterung: Serumspiegel, toxische Wirkungen, Gewichtsverlauf.....	70
4.2. DMBA: toxische Wirkungen.....	73
4.3. Klassifikationskriterien für Mamma-Tumoren der Ratte: Dignität, Histogenese und Topohistogenese.....	76

	Seite
4.4. Häufigkeit und zeitliches Auftreten spontaner Mamma-Tumoren der WISTAR-Ratte.....	88
4.5. DMBA-induzierte Mamma-Tumoren der WISTAR-Ratte.....	90
4.6. Einfluß der Chenodesoxycholsäure auf Ausbeute, Induktionszeit, Metastasierung und Lokalisation von DMBA-induzierten Mamma-Carcinomen.....	93
4.7. Extramammäre Neoplasien.....	96
4.8. Aussagekraft der Untersuchung und neue Ansätze.....	97
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	100
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	102

1. EINLEITUNG

1.1. Epidemiologische Gemeinsamkeiten von Mamma-Carcinom und Colon-Carcinom

Die malignen epithelialen Neubildungen der Brustdrüse und des Dickdarms nehmen unter den bösartigen Tumoren des Menschen eine bedeutende Stellung ein.

Nach wie vor hat das Mamma-Carcinom die höchste Inzidenz und Mortalitätsrate aller bösartigen Neubildungen bei der Frau; die Inzidenzrate steigt weiter an (8).

In der Mortalitäts-Statistik für die männliche Bevölkerung spielt das Mamma-Carcinom keine Rolle; hier steht an erster Stelle der Krebsinzidenz das Lungencarcinom.

Gleichermaßen bei beiden Geschlechtern jedoch liegt an zweiter Stelle der Krebsinzidenz das colorectale Carcinom (30); auch hier ist die Inzidenzrate steigend (8).

Diese Angaben zur Epidemiologie von Mamma- und Colon-Carcinom treffen allerdings nicht global zu, sondern im wesentlichen nur für Westeuropa und Nordamerika.

In anderen Teilen der Welt sind die Inzidenz- und Mortalitätsraten für beide Neoplasien wesentlich geringer, wobei Untersuchungen zur geographischen Verteilung der Krebshäufigkeiten in zahlreichen Ländern der Welt (23) eine enge Kopplung der Häufigkeiten für Mamma- und Colon-Carcinom erkennen lassen:

So zeigen Länder mit hoher Mamma-Carcinom-Mortalität wie Kanada, die USA (weiße Bevölkerung), die Niederlande und England u.a. ebenfalls eine hohe Mortalitätsrate an Dickdarmcarcinomen für Frauen und Männer (37). In Afrika, Asien und Südost-Europa, wo die Mamma-Carcinom-Mortalität gering ist, besteht ebenfalls eine niedrige Sterblichkeit an Darmkrebs. Daraus läßt sich eine positive Korrelation der Mamma- und Colon-Carcinom-Häufigkeit ableiten.

Auf eine enge Beziehung zwischen diesen beiden Neoplasien deutet auch die Tatsache hin, daß die Assoziation eines Colon-Carcinoms mit einem Mamma-Carcinom bei der gleichen Patientin insgesamt Überzufällig häufig auftritt, ebenso wie die Kombination des Mamma-Carcinoms mit dem Endometrium- und Ovarial-Carcinom (1).

Hierher gehört auch die Tatsache, daß die heute mit breiter Übereinstimmung als Vorläufer des Colon-Carcinoms angesehenen Colonadenome bei Frauen mit Mamma-Carcinom-Anamnese etwa 2,65mal häufiger nachweisbar sind als bei weiblichen Kontrollpersonen ohne Mamma-Carcinom (12); eine neuere Studie kommt zu einem ähnlichen Ergebnis: Das Risiko für Patientinnen mit Mamma-Carcinom, ein Colonadenom oder -Carcinom zu entwickeln, ist etwa 2,5mal höher als für Kontrollpersonen ohne Mamma-Carcinom (55).

Aus den erwähnten Angaben zur geographischen Epidemiologie ergibt sich, daß Colon- und Mamma-Carcinom bei Afrikanern und Asiaten selten, bei den meisten Europäern und der nordamerikanischen weißen Bevölkerung jedoch häufig sind. Die Vermutung einer genetisch-rassischen Disposition für die Entwicklung beider Carcinome liegt daher auf der Hand; einer epidemiologischen Überprüfung hält sie jedoch nicht stand: So zeigten zum Beispiel in die USA eingewanderte japanische Bevölkerungsgruppen einen deutlichen Anstieg der Mortalitätsrate an Colon-Carcinom (31) und Mamma-Carcinom im Vergleich zu den entsprechenden Raten in Japan; diese Tendenz zur Angleichung des Risikos für beide Carcinome an das Risiko der neuen Umgebung wurde für zahlreiche verschiedene Einwanderergruppen in mehreren Ländern bestätigt (Übersicht bei 37).

Diese Ergebnisse deuten auf einen bestimmenden Einfluß der jeweiligen Umwelt und damit auf das Vorliegen wesentlicher exogener Faktoren für die Entstehung von Mamma- und Colon-Carcinom hin.

Freilich kann für das jeweilige individuelle Risiko eine unterschiedlich ausgeprägte genetische Disposition bestehen; so muß die autosomal dominant vererbte Polyposis coli als genetisch fixierte Präkanzerose gelten, die ohne Behandlung unvermeidlich zur Entstehung von Colon-Carcinomen führt (34); beim Auftreten von Mamma-Carcinom innerhalb einer Familie steigt bei blutsverwandten weiblichen Nachkommen und Geschwistern das Mamma-Carcinom-Risiko auf das 2-3fache an (4); weiter sind inzwischen sog. Krebsfamilien bekannt, die, offenbar durch ein autosomales Gen vererbt, ein wesentlich erhöhtes Risiko für Colon-Carcinome tragen (44). Solche Kollektive mit einem genetisch verankerten erhöhten Risiko stellen aber unter den Mamma- und noch mehr unter den Colon-Carcinom-Patienten einen verschwindend geringen Prozentsatz dar.

Die epidemiologischen Daten machen in überzeugender Weise wahrscheinlich, daß ganz Überwiegend exogene Faktoren für die Entstehung von Mamma- und Colon-Carcinom verantwortlich sind.

1.2. Bedeutung der Ernährungsweise für Colon- und Mamma-Carcinom-Risiko

Gerade für das Colon-Carcinom liegt es nahe, in der Ernährungsweise einen exogenen Risikofaktor zu vermuten. Tatsächlich konnte durch internationale epidemiologische Korrelationsstudien ebenso wie durch vergleichende epidemiologische Untersuchungen an ethnischen und soziokulturellen Minderheiten (z.B. Mormonen, Sieben-Tages-Adventisten) innerhalb einer Gesamtpopulation mit deutlich unterschiedlichem Lebensstil eine enge Beziehung bestimmter Nahrungsbestandteile mit der Colon-Carcinom-Häufigkeit nachgewiesen werden.

Der Gehalt der Nahrung an Fett und tierischem Protein ist danach eng mit der Colon-Carcinom-Häufigkeit korreliert (14; 34); eine balaststoffarme Ernährung scheint ebenfalls ein Risikofaktor zu sein (13).

Im Tierexperiment an der Ratte läßt sich zeigen, daß bei chemisch induzierter Colon-Carcinogenese die Gabe einer fettreichen Diät die Ausbeute an erzeugten Carcinomen vermehrt und die Induktionszeiten verkürzt (53).

Setzt man nun, ebenfalls auf der Suche nach möglichen exogenen Risikofaktoren, die Mamma-Carcinom-Häufigkeiten mit der Ernährung in Beziehung, so zeigt sich ein ähnliches Muster wie beim Dickdarmcarcinom: die Mamma-Carcinom-Häufigkeit korreliert positiv mit der Höhe des Nahrungsgehaltes an Fett und tierischem Protein (14; 3).

Auch hier lassen sich die epidemiologischen Befunde im Tierexperiment nachvollziehen: Ein fettreiches Futter führt bei der Ratte bei chemisch induzierter Carcinogenese der Mamma zu verkürzter Induktionszeit und höherer Ausbeute; auch spontane Mamma-Carcinome bei der Ratte entstehen bei hohem Fettgehalt des Futters häufiger (19; 81).

1.3. Einflüsse der Ernährung auf die Colon- und Mamma-Carcinogenese

Zur Erklärung des wesentlichen Einflusses der Ernährung auf die Carcinogenese von Mamma und Colon kommen mehrere Mechanismen in Frage:

- Nahrungsmittel enthalten bereits im Rohzustand ein Carcinogen oder dieses Carcinogen entsteht durch bestimmte Zubereitungsarten.
- Aus den aufgenommenen Nahrungsmitteln entsteht durch metabolische Aktivierung ein Carcinogen im Körper.

- Die aufgenommene Nahrung oder ihre im Körper entstehenden Metabolite oder eine durch bestimmte Ernährungsweise im Körper sich einstellende Stoffwechselsituation hat eine die Tumorentwicklung fördernde Wirkung.

- Ein Mangel an evtl. vorhandenen protektiven Nahrungsbestandteilen fördert die Krebsentstehung.

Bis heute konnte der Nachweis nicht geführt werden, daß es in der Nahrung enthaltene Substanzen gibt, die beim Menschen Mamma- oder Colon-Carcinome erzeugen; für beide Carcinome werden dagegen unterschiedliche Mechanismen einer durch die Ernährung bedingten Tumorpromotion vermutet.

Die Entstehung von Mamma-Carcinomen wird stark beeinflußt durch hormonelle Faktoren, die das Proliferationsverhalten des Brustdrüsenepithels steuern; die Ernährung könnte über eine Veränderung des hormonellen Status ein erhöhtes Risiko erzeugen.

So konnte z.B. bei Frauen nach Umstellung auf eine vegetarische Diät ein Absinken des Prolaktinspiegels beobachtet werden; im Tierexperiment mit chemisch induzierter Mamma-Carcinogenese bei Ratten und gleichzeitiger fettreicher Diät konnte gezeigt werden, daß der Promotionseffekt der fettreichen Ernährung bei gleichzeitiger Gabe eines Prolaktinantagonisten deutlich abgeschwächt war (36).

Zahlreiche weitere experimentelle Untersuchungen deuten auf einen Einfluß des Prolaktins bei der Mamma-Carcinom-Entstehung der Ratte hin (81); die Rolle des Prolaktins als Risikofaktor beim Menschen wird allerdings nicht einheitlich beurteilt (70).

In die gleiche Richtung einer möglichen Einwirkung fettreicher Ernährung auf den Hormonhaushalt weisen Ergebnisse an Übergewichtigen Patientinnen, die eine vermehrte Produktion von Östron aus Androstendion zeigen (70).

Schließlich wird eine, in vitro angeblich bereits gezeigte Entstehung von Östrogenen im Darm durch bakteriellen Abbau von Gallensäuren und Cholesterinderivaten diskutiert (35); sowohl die Zusammensetzung der Bakterienflora im Darm als auch die Menge an mit der Galle ausgeschütteten Gallensäuren und Cholesterinderivaten ist ernährungsabhängig. Über die Beziehung einer fettreichen Diät zur Mamma-Carcinom-Entstehung wurden daneben noch allgemeinere Theorien aufgestellt, die evtl. auch auf die Colon-Carcinom-Entstehung übertragbar sind: So wird aufgrund experimenteller Ergebnisse eine immunsuppressive Wirkung von Nahrungsfetten diskutiert, ebenso wie eine Veränderung der Fettsäurekomposition der Zellmembranen mit konsekutivem Einfluß auf das Proliferationsverhalten der Zellen (77).

Die Suche nach einem in der Nahrung enthaltenen Carcinogen, das beim Menschen Colon-Carcinome erzeugt, ist bisher noch erfolglos geblieben, wenn auch aus holzkohlegrilltem Fleisch und Fisch heterozyklische Amine mit hoher mutagener Aktivität isoliert werden konnten, die eine Strukturähnlichkeit mit 3,2-Dimethyl-4-Aminobiphenyl aufweisen; mit der letztgenannten Substanz können bei Ratten Colon- und Mamma-Carcinome erzeugt werden (74).

Da der direkte Carcinogennachweis bisher also nicht gelang, wurden für das Colon-Carcinom kompliziertere Modelle entwickelt: Die Rolle der Ernährung bei der Colon-Carcinogenese wird gesehen in einer Modifikation physiologischer und metabolischer Prozesse bei Nahrungsaufnahme und Verdauung sowie in einer Modifikation der intestinalen Mikroflora. So beeinflußt z.B. ballaststoffreiche, faserhaltige Nahrung die Verweildauer des Stuhles im Darm: die Passagezeit wird verkürzt. Gleichzeitig verdünnt das größere Stuhlvolumen möglicherweise Carcinogene oder cocarcinogene Substanzen und verkürzt durch die schnellere Passage ihre Kontaktzeit mit der Darmschleimhaut.

Die protektive Wirkung faserreicher Ernährung könnte auf diesen Mechanismen beruhen.

Fettreiche Ernährung führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Gallensäuren und zu einer Beeinflussung der Bakterienflora im Darmtrakt, wodurch wiederum der Metabolismus der Gallensäuren wesentlich bestimmt wird; die Gallensäuren und ihre bakteriellen Abbauprodukte scheinen in der Colon-Carcinogenese bei Mensch und Versuchstier eine wichtige Rolle zu spielen (30).

1.4. Gallensäuren und enterohepatischer Kreislauf

Die Gallensäuren bzw. deren Salze sind wesentlicher Bestandteil der Lebergalle; sie stellen ca. 67 % der in der Galle gelösten Substanzen.

Die sog. primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure werden in der Leber von den Hepatozyten aus Cholesterin gebildet und an Taurin oder Glycin konjugiert als Cholate bzw. Chenodesoxycholate über die intra- und extrahepatischen Gallenwege zusammen mit den übrigen Bestandteilen der Galle in den Dünndarm ausgeschieden.

Gallensäuren spielen eine bedeutende Rolle bei der Ausscheidung von Cholesterin, dessen Löslichkeit in der Galle wesentlich von der Gallensäurenkonzentration abhängt; weiter sind Gallensäuren mit ihrer Fähigkeit zur Micellenbildung notwendig zur Resorption von Nahrungsfetten und fettlöslichen Vitaminen aus dem Darm.

Im terminalen Ileum werden ca. 95 % der sezernierten Gallensäuren rückresorbiert; sie gelangen über das Pfortaderblut zurück in die Leber.

Bei der Leberpassage werden die Salze der Cholsäure zu über 90 %, die der Chenodesoxycholsäure zu 75 - 80 % aus dem Pfortaderblut resorbiert und wieder in die Galle ausgeschieden.

Dieser Ablauf von Gallensäuresekretion, Rückresorption im Darm, Aufnahme in die Leberzelle und erneuter Sekretion ist als enterohepatischer Kreislauf bekannt.

Ein Teil der im terminalen Ileum nicht rückresorbierten Cholate und Chenodesoxycholate wird bei der Passage durch das Colon von spezifischen Enzymen verändert, die der mikrobiellen Darmflora entstammen.

Neben der Dekonjugation mit der Bildung freier Gallensäuren ohne Taurin- oder Glycinreste steht hier vor allem die 7α -Dehydroxilierung im Vordergrund, die aus den primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure die sog. sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure und Lithochol- bzw. 7-Keto-Lithocholsäure entstehen läßt.

Für die 7α -Dehydroxilierung der Gallensäuren sind strikt anaerobe Darmbakterien notwendig wie Clostridien oder Bacteroides.

Durch weiteren bakteriellen Abbau entstehen aus den sekundären Gallensäuren tertiäre Gallensäuren wie die Ursodesoxycholsäure (Abbildung 1, S.9).

Sekundäre und tertiäre Gallensäuren werden nach ihrer Entstehung im Colon z.T. rückresorbiert und in die Lebergalle ausgeschieden.

Während die Desoxycholsäure ca. 24 % und die Lithocholsäure ca. 4-6 % der in der Galle enthaltenen Gallensäure ausmachen (Chol- und Chenodesoxycholsäure jeweils ca. 35 %), sind die Ursodesoxycholsäure sowie mehrere weitere bakterielle Abbauprodukte der Gallensäuren nur in Spuren nachweisbar.

Gallensäuren-Synthese, Gallensäuren-Pool und Gallensäuren-Zirkulation im enterohepatischen Kreislauf hängen auf komplexe Weise miteinander zusammen; es ist jedoch auch bekannt, daß Einflüsse der Ernährung auf die Gallensäurenbildung bestehen.

GALLENSÄUREN- STOFFWECHSEL

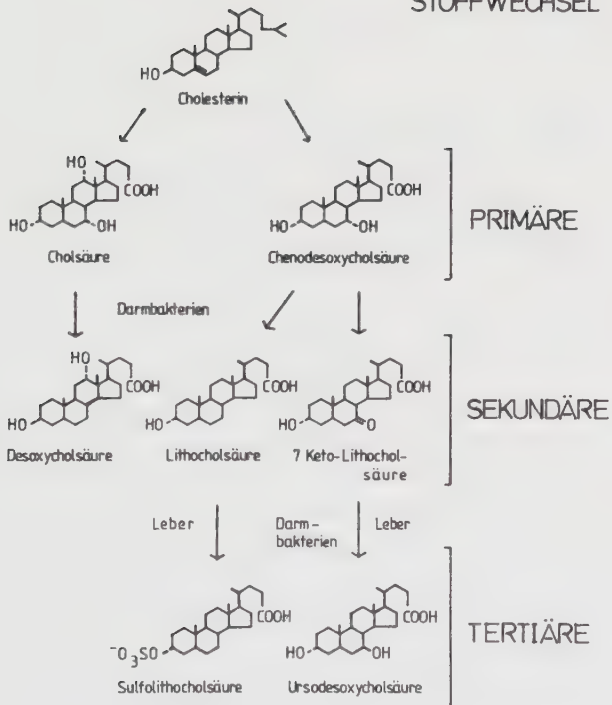


Abb.1: Stoffwechselschema der wichtigsten menschlichen primären, sekundären und tertiären Gallensäuren (nach CAREY (15), S. 432)

So führt Nahrungskarenz zu einer deutlichen Verminderung, hochkalorische Ernährung und Übergewicht zu einer Steigerung der Gallensäuren-Synthese (15).

Auch im Tierexperiment an der Ratte steigert fettreiches Futter die Synthese von Chol- und Chenodesoxycholsäure (10). Bei der Ratte, der als erwähnenswerte anatomische Besonderheit eine Gallenblase fehlt, besteht wie beim Menschen ein enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren (42).

Auch bei der Ratte werden als primäre Gallensäuren Chol- und Chenodesoxycholsäure in der Leberzelle synthetisiert; in den Hepatozyten entsteht aus Chenodesoxycholsäure z.T. α - und β -Muricholsäure (9).

Bei keimfreien Ratten kommen als weitere primäre Gallensäuren in Spuren die Allochol- und die Allodesoxycholsäure vor (25). Die Gallensäuren-Syntheserate unterliegt einem zirkadianen Rhythmus (24) und ist geschlechtsabhängig (25). Die primären Gallensäuren der Ratte unterliegen ebenfalls dem Abbau durch intestinale Bakterien; so entstehen als sekundäre Gallensäuren bei der Ratte u.a. Lithocholsäure, Desoxycholsäure und Hyodesoxycholsäure.

1.5. Gallensäuren und Colon-Carcinogenese

In den beiden vorhergehenden Abschnitten wurde dargelegt, daß die Gallensäurensekretion sowie die mikrobielle Darmflora, die für den Abbau der Gallensäuren verantwortlich ist, durch die Ernährungsweise beeinflußt werden können. Die Gallensäuren und ihre Abbauprodukte bieten sich so als mögliches Bindeglied zwischen Ernährung und Colon-Krebsentstehung an.

Untersucht man Stuhlproben von Personen aus einer Population mit hohem Colon-Carcinom-Risiko bei fettreicher Ernährung, so finden sich mehr Gallensäuren und auch neutra-

le Steroide als bei Personen aus einer Population mit niedrigerem Colon-Carcinom-Risiko und fettarmer Ernährung (54). Unterstützt wird diese Beobachtung dadurch, daß Patienten mit Colon-Carcinom, verglichen mit Personen ohne Colon-Carcinom aus der gleichen Population, mehr, und zwar vor allem sekundäre, Gallensäuren im Stuhl ausscheiden (51). Bei der strukturellen Ähnlichkeit der Gallensäuren mit bekannten carcinogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen lag zunächst die Annahme nahe, daß aus den Gallensäuren durch bakteriellen Umbau über sekundäre und tertiäre Abbauprodukte hinaus eine carcinogene Verbindung entstehen könnte; in vitro wurde die Bildung von 20-Methyl-Cholanthren, einem potenten Carcinogen, aus Desoxycholsäure nachgewiesen (5). Allerdings gelang bis heute der Nachweis eines in vivo unter Mitwirkung bakterieller Enzyme aus Gallensäuren gebildeten Carcinogens nicht.

Vor längerer Zeit war zwar einmal eine direkte tumor erzeugende Wirkung einer Gallensäure mit Entstehung maligner Weichgewebstumoren der Maus nach mehrfacher lokaler subcutaner Injektion größerer Mengen von Desoxycholsäure beschrieben worden; eine onkogene Wirkung des verwendeten Lösungsmittels konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden (16).

Im Tierexperiment an der Ratte wirken die Gallensäuren selbst nicht als Carcinogene der Colon-Schleimhaut; die rektale Instillation von Chenodesoxycholsäure, Cholsäure (52), Lithocholsäure oder Taurodesoxycholsäure (47) erzeugte bei den Versuchstieren keine Darmtumoren.

Nach vorausgegangener intrarectaler Applikation des Carcinogens N-Methyl-N'-Nitro-N'-Nitrosoguanidin konnte jedoch durch die darauffolgende wiederholte rectale Applikation der oben erwähnten Gallensäuren die Ausbeute an Adenomen und Carcinomen signifikant gesteigert werden (52, 47).

Verfüttert man Ratten nach Applikation des darmwirksamen Carcinogens 1,2-Dimethylhydrazin die primäre Gallen-

säure Chenodesoxycholsäure, so wird die Ausbeute an Dickdarm-Tumoren deutlich gesteigert; die orale Aufnahme von Chenodesoxycholsäure allein erzeugt dagegen keine Tumoren (62).

Die Wirkungsweise der untersuchten Gallensäuren bei der experimentellen Colon-Carcinogenese der Ratte kann daher als Tumorpromotion charakterisiert werden.

Als möglicher Mechanismus einer Tumorpromotion wird unter anderem eine Veränderung der Proliferationskinetik intestinaler Schleimhautzellen durch verschiedene Gallensäuren diskutiert (26).

Gallensäuren sind außerdem Co-Mutagene (66), und erzeugen in Hefekulturen mitotische Aneuploidien (26).

Bei der Frage nach der Übertragbarkeit dieser experimentellen Befunde auf den Menschen darf nicht vergessen werden, daß ein Tumorpromotor seine Wirkung nur bei Anwendung über einen langen Zeitraum entfalten kann.

So wird z.B. die orale Gallensäurentherapie zur Litholyse von Gallensteinen mit Cheno- und Ursodesoxycholsäure nur über einen relativ kurzen Zeitraum angewandt, so daß ein Ansteigen von Colon-Carcinomen bei diesen Patienten als Folge einer Tumorpromotionswirkung von Gallensäuren nicht wahrscheinlich ist; bisher liegen jedenfalls keine Berichte vor, die ein solches erhöhtes Colon-Carcinom-Risiko nach Gallensäurentherapie zeigen.

Neben der oralen Gallensäurentherapie wird aber auch noch auf andere Weise iatrogen in den Gallensäurenmetabolismus und enterohepatischen Kreislauf eingegriffen: So führt die Cholezystektomie zu einer schnelleren Zirkulation der Gallensäuren im enterohepatischen Kreislauf sowie zu einem relativen und absoluten Anstieg der sekundären Gallensäuren, vor allem der Desoxycholsäure im Gallensäurenpool (78).

Da der Zustand nach Cholezystektomie bei vielen Menschen über Jahrzehnte besteht, ist die Frage legitim, ob

diese Patienten mit verstärktem Gallensäurenfluß auch ein erhöhtes Risiko für Colon-Carcinome aufweisen.

Zahlreiche Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Cholezystektomie und Colon-Carcinom liegen vor, die Ergebnisse sind jedoch weitgehend widersprüchlich.

So zeigten einige retrospektive klinische Studien ein gehäuftes Auftreten von vorhergehender Cholezystektomie bei Frauen mit Colon-Carcinomen, während andere Untersucher diese Ergebnisse nicht bestätigen konnten; z.T. fand sich jedoch als übereinstimmender Befund eine Verschiebung der Colonicarcinomhäufigkeiten in das rechte Colon (78).

Bei der Auswertung von Obduktionsstatistiken ergab sich ein erhöhtes Risiko für Colon-Carcinome nach Cholezystektomie nur bei Frauen, und auch dann nur, wenn man Patientinnen mit Schrumpfgallenblasen in die Gruppe der cholezystektomierten Patientinnen aufnahm, unter der Vorstellung, daß eine Schrumpfgallenblase als Endstadium der chronischen Gallenblasenentzündung funktionell dem Zustand nach Cholezystektomie entspricht (75).

Wenn man Colon-Adenome als mögliche Vorläufer von Colon-Carcinomen mit in die Betrachtung aufnimmt, dann läßt sich feststellen, daß ein gehäuftes Auftreten von Adenomen und Carcinomen des Dickdarms nur in der Altersgruppe der 60- bis 80-jährigen nach einer mehr als 10 Jahren zurückliegenden Cholezystektomie nachweisbar ist; bei jüngeren Patienten bewirkte auch eine länger zurückliegende Cholezystektomie kein erhöhtes Risiko (46).

Ein direkter Zusammenhang zwischen vorausgegangener Cholezystektomie und der Colon-Carcinom-Entstehung konnte also bisher nicht bewiesen werden. Am ehesten ist noch wahrscheinlich, daß Erkrankungen, die zur Cholezystektomie führen und das Colon-Carcinom gemeinsame Risikofaktoren haben. Als solchen Risikofaktor könnte man z.B. einen qualitativ und quantitativ veränderten Gallensäuren-Pool diskutieren.

Faßt man die bisher referierten Ergebnisse zusammen, so ergibt sich folgendes Bild: Die epidemiologisch beobachtete Korrelation zwischen fettreicher Ernährung und erhöhtem Colon-Carcinom-Risiko könnte durch die Wirkung von Gallensäuren erklärt werden, unter der Annahme, daß Gallensäuren, insbesondere sekundäre Gallensäuren, beim Menschen wie im Tierexperiment bei der Colon-Carcinogenese als Tumormotoren wirken; eine vermehrte Gallensäuresekretion sowie eine Veränderung der intestinalen Darmflora, die zur Bildung von mehr sekundären Gallensäuren führt, wird durch eine fettreiche Ernährung hervorgerufen.

1.6. Gallensäuren und Mamma-Carcinom

Im vorausgegangenen Abschnitt wurde bei der Erörterung einer tumorpromovierenden Wirkung von Gallensäuren stillschweigend von einer Wirkung der Gallensäuren und ihrer Derivate auf die Colon-Schleimhaut vom Lumen her ausgegangen. Das gleichzeitige Vorliegen einer hämatogenen Komponente ist aber nicht ausgeschlossen.

Im Tierexperiment an Ratten ist die Anzahl der durch 1,2-Dimethylhydrazin induzierten Dünndarm- und Dickdarm-Tumoren bei Vorliegen einer im distalen Coecum angelegten Colostomie stark verringert, wobei die Abnahme der Tumorzinzidenz nicht in dem ausgeschalteten Dickdarm-Abschnitt besonders ausgeprägt ist, sondern wesentlich deutlicher in den Darmabschnitten proximal des Colostomas.

Appliziert man nun in Form einer Spülung Rattengalle in das ausgeschaltete Colon, so steigt die Tumorausbeute im vorgeschalteten Darmabschnitt deutlich an (79).

Daraus läßt sich die Überlegung ableiten, daß die Entwicklung dimethylhydrazin-induzierter Darm-Tumoren bei der Rat-

te deutlich beeinflußt wird durch Gallekomponenten, die im Colon resorbiert werden, wobei offen bleibt, ob diese Gallekomponenten mit tumorpromovierender Wirkung nach Leberpassage via Galle von der Oberfläche her an die intestinale Schleimhaut gelangen oder ob sie gleichzeitig oder ausschließlich hämatogen das Darmepithel erreichen.

Bei den colostomierten Versuchstieren ergaben sich nicht nur Veränderungen der Zusammensetzung der Lebergalle, sondern auch Änderungen in der Zusammensetzung der Gallensäuren im peripheren Blut. So war z.B. die primäre Gallensäure Chenodesoxycholsäure im peripheren Blut der Versuchstiere nur noch in Spuren nachzuweisen (unveröffentlichte Ergebnisse Prof. Wiebecke).

Auch beim Menschen sind Gallensäuren im peripheren venösen Blut messbar; beim fastenden gesunden Menschen in einer relativ konstanten Konzentration von insgesamt 1 - 5 $\mu\text{M/l}$. Die Menge der im peripheren Blut vorhandenen Gallensäuren resultiert aus der intestinalen Aufnahme und der inkompletten Plasmaclearance der Gallensäuren bei der Leberpassage. Die Gallensäurezusammensetzung in Blut und Lebergalle ist unterschiedlich, da Cholate im Darm weniger gut resorbiert, in der Leber aber schneller aus dem Plasma entfernt werden; bei Nahrungskarenz sind daher die Konjugate der Chenodesoxycholsäure die vorherrschenden Gallensäuren im Blut.

Während der Nahrungsaufnahme und der dadurch bedingten Gallenblasenentleerung läßt sich ein Anstieg der Blutwerte auf das 2-5fache des Ausgangswertes zeigen.

Der Gehalt an primären und sekundären Gallensäuren im peripheren Blut des Menschen ist also abhängig von der sezernierten und reabsorbierten Menge an Gallensäuren (15).

Wenn es nun wahrscheinlich ist, daß die Gallensäuren bzw. ihre Derivate das Bindeglied zwischen Ernährungsweise und

Colon-Carcinom-Risiko darstellen und dabei eine hämatogene Wirkungskomponente der Gallensäuren nicht ausgeschlossen werden kann, dann stellt sich die Frage, ob das mit einer ähnlichen Ernährungsweise korrelierte Mamma-Carcinom-Risiko nicht ebenfalls durch Gallensäuren bzw. deren Metabolite vermittelt wird.

Die Prüfung dieser Frage verlangt ein geeignetes experimentelles Versuchsmodell.

1.7. Überlegungen zur Wahl des Versuchsmodells

Für die Überprüfung des vermuteten Einflusses von Gallensäuren, insbesondere der Chenodesoxycholsäure, auf die Mamma-Carcinom-Entstehung scheint es notwendig und sinnvoll, einen experimentellen Ansatz in Form eines Tierversuchs zu wählen.

Das biologische Modell sollte charakterisiert sein durch einfache Handhabung und Haltung der Tiere, durch eine leichte Induzierbarkeit und eine möglichst steuerbare Ausbeute von Mamma-Carcinomen.

Als Versuchstier zur Erzeugung von Mamma-Carcinomen besonders geeignet erwies sich die Laboratoriums-Ratte, die ihre Herkunft von der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) ableitet.

Das spontane Auftreten von Mamma-Tumoren bei der Ratte ist seit langem bekannt (22); durch chemische Carcinogene und ionisierende Strahlen lassen sich bei der Ratte mit hoher Ausbeute Mamma-Tumoren induzieren, die morphologisch und biologisch - wenn auch mit Einschränkungen - den menschlichen Mamma-Tumoren vergleichbar sind.

Die Virus-Ätiologie von Mamma-Tumoren, wie sie z.B. bei den Mamma-Tumoren der Maus ganz im Vordergrund steht,

scheint bei der Ratte eher keine Rolle zu spielen und ist bis heute jedenfalls nicht schlüssig bewiesen; diese Tatsache ist für die Bewertung der Wirkung von Carcinogenen und Co-Carcinogenen im Tierversuch mit der Ratte ebenso von Bedeutung wie die bei der Ratte gegebene Möglichkeit, durch Inzuchtstämme über Generationen hinweg eine hohe Konstanz des genetischen Materials zu erreichen. Die Haltung der Ratten ist einfach, ihre relativ kurze Lebensdauer von ca. drei Jahren ermöglicht eine Beobachtung der Versuchstiere über die gesamte oder einen größeren Teil der Lebensspanne.

Größere Säugetiere wie Katze und Hund entwickeln zwar auch Mamma-Tumoren; als Versuchstiere zur Untersuchung der Mamma-Carcinogenese scheinen sie jedoch nicht nur wegen der aufwendigeren Haltung ungeeignet, sondern auch wegen der deutlichen biologischen und morphologischen Unterschiede der entstehenden Mamma-Tumoren zu denen des Menschen (82; 83).

Die oben aufgeführten Gesichtspunkte machen die Ratte zum bei weitem bevorzugten Versuchstier für chemisch-induzierte Mamma-Tumoren; an diesem Versuchsmodell wurde bis heute eine Vielzahl von Experimenten durchgeführt, z.B. zur Untersuchung hormoneller und ernährungsbedingter Einflüsse auf die Mamma-Carcinogenese (69; 83).

Die angewandten mammotropen Carcinogene entstammen ganz überwiegend der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wie das 3-Methylcholanthren oder im Besonderen das 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA). Daneben finden aromatische Amine wie das 2-Acetylaminofluoren Verwendung oder N-Nitroso-Verbindungen wie z.B. N-Nitrosomethyl-Harnstoff oder Hydrazine wie das Diäthylhydrazin (Übersicht bei 69).

Die chemischen Carcinogene werden in organischen Lösungsmitteln wie Sesamöl lokal epicutan oder subcutan appli-

ziert; die Verabreichung erfolgt auch oral mit der Schlundsonde oder intravenös.

Dabei ist zu beachten, daß die Tumorausbeute beim gleichen Carcinogen abhängig ist von der Applikationsart, der Dosierung und einer evtl. Wiederholung der Applikation. Die Tumorausbeute ist weiter abhängig vom Geschlecht sowie vom Lebensalter der Tiere und vom verwendeten Tierstamm.

Weibliche Ratten sind wegen ihres hormonellen Status für die chemisch induzierten Mamma-Carcinome wesentlich empfänglicher als männliche.

Das Lebensalter, bei dem durch Carcinogengabe die höchste Ausbeute an Mamma-Tumoren erreicht werden kann, liegt z.B. für Sprague-Dawley-Ratten bei DMBA-induzierter Mamma-Carcinogenese bei 50 - 60 Lebenstagen.

Die Tumorausbeute ist weiter ganz wesentlich abhängig vom verwendeten Tierstamm.

Die Sensibilität verschiedener Rattenstämme gegenüber demselben Carcinogen kann extreme Unterschiede zeigen. So entwickeln z.B. nach mehrfacher Gabe von DMBA mit der Schlundsonde Sprague-Dawley-, Wistar-, August- und Chester-Beatty-Ratten zu 90 - 100 % aller Versuchstiere Mamma-Tumoren; in der gleichen Versuchsanordnung entstehen bei Marshall-Ratten keine Mamma-Tumoren (11).

Bei einmaliger Gabe von 20 mg DMBA in Sesamöl mit der Schlundsonde entwickelten Sprague-Dawley-Ratten zu 100 % aller Versuchstiere nach 60 Tagen sichtbare Mamma-Tumoren; alle Tiere trugen Carcinome (38).

Eine andere Untersuchung berichtet bei gleicher Applikationsart und Dosierung von DMBA über unterschiedliche Tumorausbeute und Induktionszeit bei Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten: Wistar-Ratten entwickelten nach durchschnittlich 22 Wochen zu 64 % Carcinome, Sprague-Dawley-Ratten trugen nach 16 Wochen mittlerer Induktionszeit bereits zu 80 % Carcinome (29).

Die unkomplizierte Versuchsanordnung mit einmaliger Gabe von 20 mg DMBA pro Tier mit der Schlundsonde sowie die deutlich geringere Tumorausbeute bei Wistar-Ratten im Verhältnis zu Sprague-Dawley-Ratten lassen das eben beschriebene Versuchsmodell bei Verwendung von Wistar-Ratten zur Testung eines vermuteten Co-Carcinogens bzw. Tumorpromotors geeignet erscheinen; dabei wird von der Vorstellung ausgegangen, daß eine geringere Tumorausbeute (ca. 60 % tumortragende Tiere) einen evtl. tumorpromovierenden oder cocarcinogenen Effekt deutlicher hervortreten läßt.

Das 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA) ist eine Verbindung aus der chemischen Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (Abbildung 2, S. 20).

Aus DMBA entstehen unter Mitwirkung mikrosomaler mischfunktioneller Oxidasen hochreaktive elektrophile Dihydrodiolepoxide, die Addukte mit der DNS bilden und als die eigentliche, carcinogene, initiierende Wirkungsform des DMBA angesehen werden (64).

DMBA bedarf also zur Entfaltung seiner tumorerzeugenden Wirkung einer metabolischen Aktivierung und Umwandlung in carcinogene Derivate. Diese Aktivierung scheint in verschiedenen Organen in unterschiedlichem Ausmaß abzulaufen; bei der Ratte ist diese metabolische Aktivierung am stärksten ausgeprägt in Mamma und Lunge, in geringerem Maß in Leber und Niere.

In dieser Organverteilung aktivierter Metabolite des DMBA wird eine mögliche Erklärung zur Organotropie des Carcinogens gesehen (64).

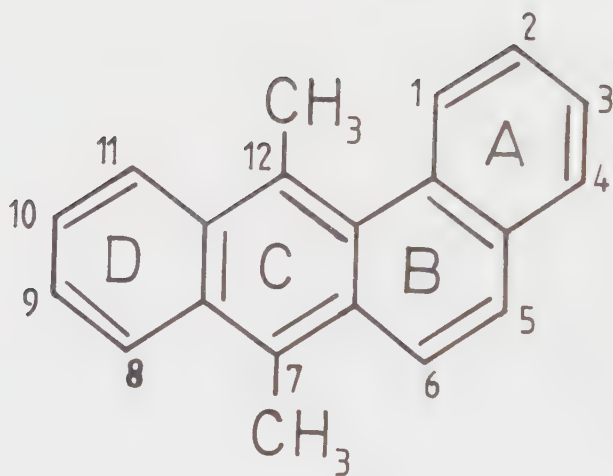


Abb.2: 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA)

1.8. Anatomie, Histologie und postnatale Entwicklung
der Milchdrüse der Ratte

Die Ratte besitzt als Milchdrüsen bezeichnete Hautanhangsdrüsen, deren Sekret zur Ernährung der neugeborenen Jungtiere dient.

In der Regel trägt die Ratte sechs Milchdrüsenpaare entlang der sog. Milchleiste, die an der ventralen Rumpfwand cranio-caudal von der Achselhöhle zur Inguinalregion verläuft.

Bei der weiblichen Ratte bilden die Milchdrüsen unter der Haut gelegene flache Weichgewebsplatten, die die vordere Rumpfwand teilweise bedecken (Abbildung 3, S. 22); dabei ist die Ausdehnung des Drüsengewebes alters- und funktionsabhängig.

Das zervikale (erste) Milchdrüsenpaar reicht cranial an der Halsvorderseite bis zur Ohrspeicheldrüse und zur mandibulären Speicheldrüse, seitlich bis auf die oberen und medialen Anteile des proximalen Vorderlaufs; nach caudal schließt das zweite Milchdrüsenpaar an.

Das craniale-thorakale (zweite) und das caudale-thorakale (dritte) Milchdrüsenpaar erstreckt sich von der Achselhöhle bis zum Rippenbogen, wobei beide Drüsen sich teilweise überlappen.

Das abdominale (vierte) Milchdrüsenpaar bedeckt die mittleren Anteile der Bauchwand nach caudal bis in Höhe des Hüftgelenks, wobei eine teilweise Überlappung mit dem cranialen-inguinalen Drüsenpaar auftritt.

Das craniale-inguinale (fünfte) Milchdrüsenpaar und das caudale-inguinale (sechste) Milchdrüsenpaar erstrecken sich nach caudal bis zur Analregion, wobei beide Drüsen im Bereich der Regio pubica aneinandergrenzen; seitlich reicht das Drüsengewebe bis auf die mediale Fläche des Hinterlaufs (83).

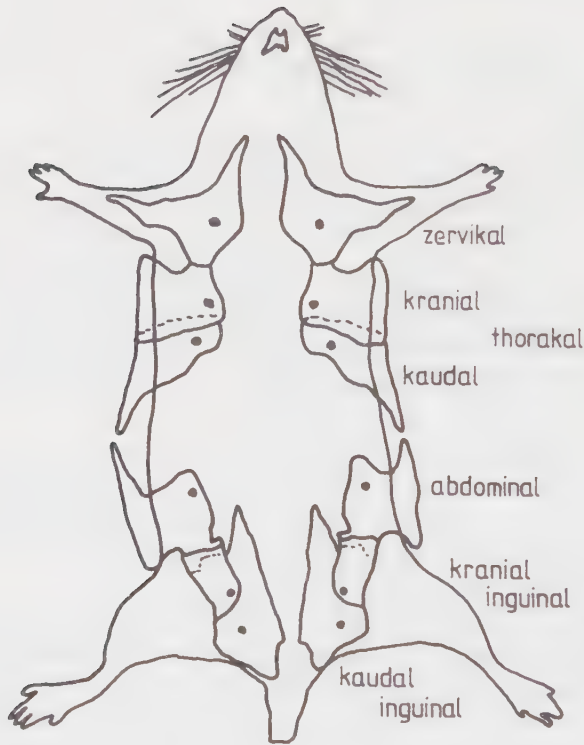


Abb.3: Lokalisation und ungefähre Ausdehnung der sechs Milchdrüsenpaare einer erwachsenen weiblichen Ratte.

Die außerhalb des Körperumrisses gezeichneten Drüsenanteile repräsentieren die der seitlichen Rumpfwand anliegenden Drüsenareale.

(aus ZWIETEN (83), S. 54)

Die Milchdrüsenpaare zwei, drei und vier nehmen eine deutlich größere Oberfläche ein als die Milchdrüsenpaare eins, fünf und sechs (56).

Die beschriebene teilweise Überlappung der Drüsenpaare zwei und drei sowie vier und fünf kann unter Umständen die definierte Zuordnung von makroskopischen Veränderungen zu den einzelnen Drüsen erschweren; in solchen Fällen scheint die Orientierung an der nächstgelegenen Mamille sinnvoll. Die Milchdrüse der Ratte entspricht in ihrem histologischen Aufbau einer gemischt tubulo-alveolären Drüse mit einem einzigen Ausführungsgang (Hauptmilchgang), der sich bei der weiblichen Ratte im Bereich der Mamille zunächst sinusförmig erweitert und dann auf der Mamillenoberfläche mündet. In der ruhenden Drüse ist die Öffnung des Ausführungsganges durch eine solide epitheliale Zellschicht verschlossen. Die männliche Ratte besitzt keine Mamillen, der vorhandene Hauptmilchgang durchbricht die Epidermis nicht. Die Struktur der Milchdrüse ist beim männlichen und weiblichen Tier prinzipiell gleich, die Drüse ist jedoch nur beim weiblichen Tier voll ausgebildet (82).

Der Hauptmilchgang teilt sich durch zahlreiche Verzweigungen in kleinere Gangstrukturen auf, an deren Ende die sekretorischen Einheiten der Drüse liegen. Sie werden als Läppchen (Lobuli) oder lobulo-alveoläre Einheit bezeichnet.

Die Läppchen bestehen aus einem terminalen kleinen Gangsegment (intralobulärer Ganganteil) und den von diesem Gangsegment ausgehenden ausgestülpten Drüsenendstücken, die dicht gelagert als Azini (oder Alveoli oder Ductuli) den intralobulären Gang umgeben. Zwischen den Läppchen verlaufen die interlobulären Gänge, die sich zu immer größeren Gängen vereinigen, die schließlich im Hautmilchgang münden (Abbildung 4, S. 24).

Das Drüsenparenchym ist eingebettet in Fettgewebe, das durchzogen wird von schmalen kollagenen Septen, in denen die Blutgefäße verlaufen.

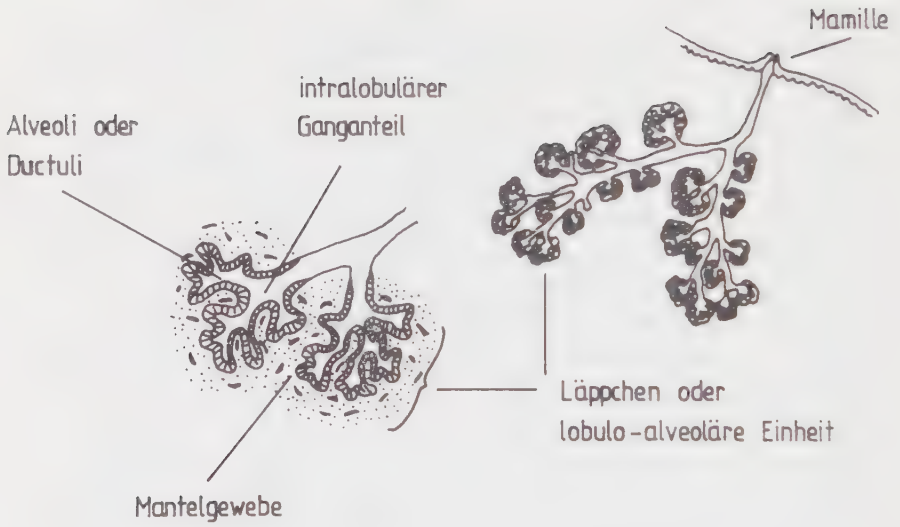


Abb.4: Histologischer Aufbau der Milchdrüse der Ratte
(Schema)
(modifiziert nach ZWIETEN (83), S. 62)

Große und mittlere Gänge sind von einer Scheide aus dichtem kollagenem Bindegewebe umgeben; in der Peripherie der Drüse ist dieses Mantelgewebe schwächer ausgebildet.

Das bindegewebige Stroma der Lobuli unterscheidet sich deutlich von dem der Gänge. Die Lobuli sind in ein lockeres Bindegewebe mit feinen kollagenen Fasern eingelagert, in dem sich Fibroblasten und reichlich Grundsubstanz finden; daneben enthält das lobuläre Stroma Mastzellen, Lymphozyten, Plasmazellen und einzelne granulozytäre Zellen (zu Anatomie und Histologie siehe 83).

Gänge und Azini sind ausgekleidet von einem ein- bis zweischichtigen kubischen bis zylindrischen Epithel, wobei zwischen Epithel und Basalmembran ein Netzwerk von myoepithelialen Zellen eingelagert ist.

Diese myoepithelialen Zellen synthetisieren offenbar die Basalmembran; sie besitzen die Fähigkeit zur Kontraktion unter Oxytozin-Einfluß.

Die myoepithelialen Zellen leiten sich wahrscheinlich von derselben Stammzelle im Gangparenchym ab wie die sekretorischen Epithelzellen (73).

Wachstum und Differenzierung des Drüsenparenchyms sind hormonabhängig. Östrogene sind notwendig für das Wachstum und die Teilung der Gänge, möglicherweise in Verbindung mit Wachstumshormon; zur Ausbildung der Endstücke mit ihren Azini sind zusätzlich Progesteron und Prolaktin erforderlich. Der jeweiligen Hormonsituation entsprechend spiegeln sich diese Einflüsse in der Morphologie der Milchdrüse während des ovariellen Zyklus.

Die postnatale Entwicklung der Milchdrüse der weiblichen Ratte ist an Sprague-Dawley-Ratten intensiv untersucht worden. Bei der neugeborenen Ratte findet sich bereits der Hauptmilchgang angelegt, der zur Peripherie hin in drei bis fünf sekundäre Gänge aufgezweigt ist.

Durch Aussprossen der sekundären Gänge entstehen neue Gangstrukturen, die in kolbenartig aufgetriebenen Prolifera-

tionsknospen (terminal end bud, TEB) mit drei bis sechs Epithellagen enden (Abbildung 5, S. 27); daneben finden sich ähnliche seitliche Aussprossungen mit geringerer Zelldichte (lateral bud, LB). Die Proliferationsknospen zeigen einen hohen Markierungsindex bei Autoradiographie mit tritiummarkiertem Thymidin.

Ihre maximale Anzahl erreichen die Proliferationsknospen am Ende der dritten Lebenswoche, wobei der Markierungsindex und die Zellzahl der Proliferationsknospen noch bis zum 40. Tag zunehmen.

Nach der dritten Lebenswoche verringert sich die Anzahl der Proliferationsknospen durch Umwandlung in Alveolarknospen (alveolar bud, AB), aus denen im weiteren Verlauf mit Beginn des Östrus die Drüsenendstücke (Azini) entstehen. Ein Teil der Proliferationsknospen bildet sich zurück zu blindenden terminalen Gängen (terminal duct, TD), die mit einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet sind.

Die Anzahl der Alveolarknospen und terminalen Gänge nimmt bis zum 70. Lebenstag zu; ca. ab dem 40. Lebenstag entstehen aus den Alveolarknospen Läppchen mit Drüsenendstücken (Azini) (57; 59).

Die DMBA-induzierte Ausbeute an Mamma-Tumoren bei der weiblichen Ratte korreliert mit der Zahl der Proliferationsknospen zum Zeitpunkt der Carcinogengabe und ihrer durch den DNS-Markierungsindex charakterisierten DNS-Syntheserate. Die Abhängigkeit der Tumorausbeute vom Alter der Versuchstiere bei Gabe des Carcinogens wird offensichtlich bestimmt durch den Entwicklungszustand der Milchdrüse und ihren Gehalt an nicht ausdifferenzierten proliferierenden epithelialen Strukturen.

So zeigen die Proliferationsknospen nach DMBA-Gabe eine Größenzunahme, gesteigerte mitotische Aktivität und Übergang in intraductale Proliferationen, die als die Vorläufer der experimentell erzeugten Mamma-Carcinome angesehen werden (56).

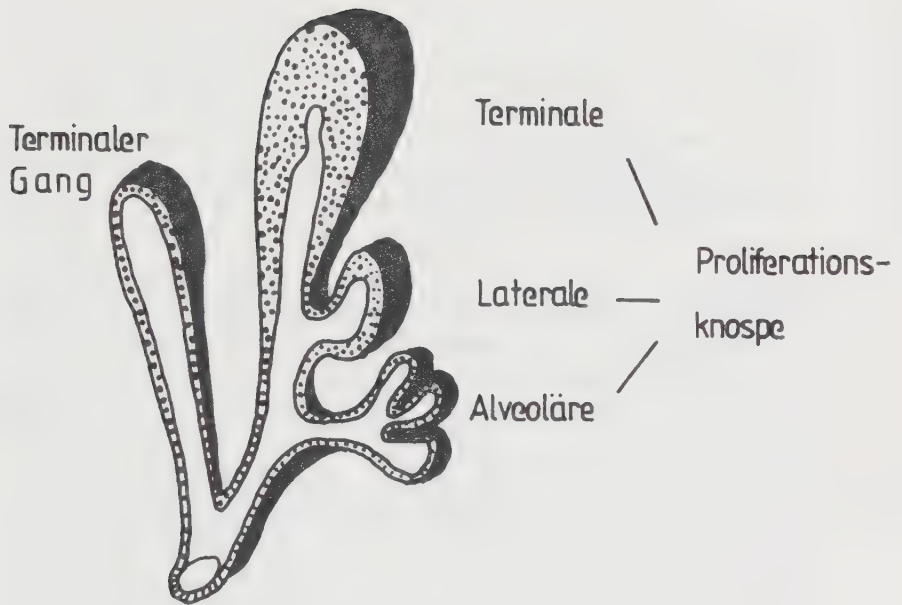


Abb.5: Terminale Strukturen des Milchdrüsenbaums
einer jugendlichen weiblichen Ratte (Schema).
(aus RUSSO et al. (59))

1.9. Fragestellungen

Die vorausgegangenen Abschnitte legen dar, aus welchen Überlegungen ein Einfluß der Chenodesoxycholsäure auf die Mamma- Carcinogenese vermutet werden kann und begründen die Wahl des experimentellen Versuchsmodells, nämlich der DMBA-induzierten Mamma-Carcinogenese der Wistar-Ratte, zur Überprüfung der Hypothese.

Im einzelnen soll untersucht werden, ob die Aufnahme von Chenodesoxycholsäure im Futter nach DMBA-Gabe beim Versuchstier die Ausbeute an Mamma-Carcinomen und -Adenomen oder das Carcinom-Adenom-Verhältnis beeinflußt und ob sich Einwirkungen auf Induktionszeit, Wachstumsgeschwindigkeit oder Lokalisation der Tumoren zeigen.

Mögliche Einflüsse der Chenodesoxycholsäureverfütterung auf die Entstehung extramammärer Neoplasien sind ebenfalls Bestandteil der Fragestellung.

In einer weiteren Versuchsanordnung soll geprüft werden, ob die Aufnahme von Chenodesoxycholsäure im Futter bei der Ratte zu einer Veränderung des Serumspiegels der Chenodesoxycholsäure im peripheren (venösen) Blut führt und welche Veränderungen in der prozentualen Zusammensetzung der Gallensäuren im peripheren (venösen) Blut auftreten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere: Herkunft und Haltung

Als Versuchstiere verwendet wurden weibliche Wistar-Ratten (AF/Hann) aus einem Inzuchtstamm eigener Zucht.

Bei Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Alter von 50 Tagen, das mittlere Gewicht betrug 131,7 g bei einer Standardabweichung von 17,3 g.

Die Versuchstiere wurden einzeln in durchsichtigen Makrolonkäfigen mit steriler Labortiereinstreu aus Holzspänen gehalten; die Einstreu wurde bei der Reinigung der Käfige zweimal wöchentlich erneuert.

Im klimatisierten Tierstall (Temperatur 22-23 °C) herrschte während des Versuchs ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus mit jeweils zwölfstündigen Hell-Dunkel-Perioden.

Die Tiere erhielten Wasser (Leitungswasser) und Trockenfutter ad libitum.

Als Trockenfutter kam die Altromin-Standarddiät (Ratte/Maus, pelletiert) zur Anwendung, wobei nach Herstellerangabe in der für alle Versuchstiere gleichen Grunddiät u.a. folgende Stoffe enthalten waren:

18,0% Rohprotein
6,0% Rohfaser
3,8% Rohfett

sowie Aminosäuren, Elektrolyte und die Vitamine A, D₃ und E.

2.2. Applikation des Carcinogens 7,12-Dimethylbenz(a)
anthrazen (DMBA) und der Chenodesoxycholsäure:
Bildung von Versuchs- und Kontrollgruppe

Als Carcinogen verwendet wurde 7,12-DMBA mit einem Reinheitsgrad von ca. 98 % (Hersteller Fluka AG, Chem. Fabrik Buchs).

Die Applikation des in Sesamöl gelösten DMBA erfolgte mit Schlundsonde und Dosierpistole bei 60 zufällig ausgewählten Versuchstieren, die auf zwei zahlenmässig gleiche Gruppen verteilt waren, wobei jedes Versuchstier eine einmalige orale Dosis von 20 mg DMBA erhielt.

Zur Verfütterung der Chenodesoxycholsäure wurde die Gallensäure vom Futterhersteller der Grunddiät beigelegt, wobei der Gehalt an Chenodesoxycholsäure im Futter 0,85 mg/g betrug bei einem Reinheitsgrad der verwendeten Gallensäure von ca. 90 %. (Analyse von Gehalt und Reinheit ausgeführt von Dr. Stellaard, II. Med. Klinik, Klinikum Großhadern der Universität München; zur Methode vergl. (67)).

Vom Tag der Carcinogen-Applikation an wurde eine Gruppe (im folgenden Versuchsgruppe genannt) ausschließlich mit chenodesoxycholsäurehaltigem Futter versorgt, während die andere Gruppe (im folgenden Kontrollgruppe genannt) chenodesoxycholsäurefreie Standard-Diät erhielt. Bei einer durchschnittlichen Futteraufnahme von ca. 15 g täglich, betrug die durchschnittliche Tagesdosis an oral zugeführter Chenodesoxycholsäure am Versuchsbeginn ca. 90 mg/Kg Körpergewicht; mit der Zunahme des Körpergewichts der Tiere während des Versuchs verringerte sich diese Dosis entsprechend.

Da innerhalb von fünf Tagen nach Carcinogen-Applikation in der Versuchsgruppe 9 und in der Kontrollgruppe 11 Tiere verendeten, wurden (sieben Tage nach Versuchsbeginn) weitere 30 Tiere (Kontroll- und Versuchsgruppe je 15) unter den gleichen oben aufgeführten Bedingungen in den Versuch aufgenommen.

(Der verschobene Versuchsbeginn dieser Tiere ist bei der Berechnung von Überlebenszeit bzw. Tumorinduktionszeiten berücksichtigt).

2.3. Versuchsprotokoll

Alle Tiere wurden bei Versuchsbeginn sowie während der Dauer des Versuchs einmal wöchentlich am selben Tag gewogen.

Beginnend mit dem 28. Versuchstag wurden die Versuchstiere einmal wöchentlich bis zum Versuchsende durch Inspektion und Palpation auf Tumorentwicklung der Milchdrüsen untersucht und dabei Lage (R1-R6 für die rechtsseitigen, L1-L6 für die linksseitigen Milchdrüsen), Größe und Größenveränderungen getasteter und sichtbarer Mamma-Tumoren protokolliert.

Daneben fanden alle weiteren äußerlich erkennbaren Auffälligkeiten und Verhaltensänderungen Aufnahme in das Protokoll.

Während des Versuchs verendete Tiere wurden nach Möglichkeit sofort seziert oder tiefgefroren und innerhalb weniger Tage obduziert.

Am Versuchsende wurden die überlebenden Tiere durch Genickbruch getötet, rasiert und mit Enthaarungsschaum enthaart. Nach Ablösung der Haut über Brust und Bauch wurden die Mammae den Mamillen zugeordnet freipräpariert, entnommen und einzeln in Formalin (10 %ige wässrige Formaldehydlösung) fixiert.

Jedes Versuchstier wurde anschließend obduziert; dabei wurden Herz, Lungen, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Ovarien, mandibuläre Speicheldrüsen, ein Wirbelkörper, Teile von Magen, Dünn- und Dickdarm sowie evtl. auffällige weitere Organe (z.B. Lymphknoten) entnommen und in Formalin fixiert.

Von den entnommenen Gewebsstücken wurden nach Paraffineinbettung histologische Schnittpräparate angefertigt, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden.

Da wegen der zeitintensiven aufwendigen Präparation der Mammae die Versuchstiere nicht am selben Tag getötet und obduziert werden konnten, ergaben sich für die Versuchstiere gering unterschiedliche Überlebenszeiten.

(Mittlere Versuchsdauer aller Versuchstiere:

Versuchsgruppe: 215 Tage/Tier (2-309 Tage)

Kontrollgruppe: 193 Tage/Tier (2-314 Tage).

Mittlere Versuchsdauer der überlebenden Tiere nach Auftreten des ersten Carcinoms am 106. Versuchstag:

Versuchsgruppe: 190 Tage/Tier (42-210 Tage)

Kontrollgruppe: 194,5 Tage/Tier (42-217 Tage)).

2.4. Bestimmung der Gallensäuren-Konzentration im peripheren Blut der Versuchstiere

Zur Untersuchung der Konzentration und Zusammensetzung der Gallensäuren im peripheren venösen Blut der Ratte bei Chenodesoxycholsäureverfütterung erhielten je drei weibliche und männliche Ratten 12 Tage lang chenodesoxycholhaltiges Futter ad libitum (Versuchsgruppe), während eine Kontrollgruppe von je drei weiblichen und männlichen Ratten über denselben Zeitraum Standard-Diät ohne Chenodesoxycholsäure als Futter erhielt.

Die Versuchstiere hatten ein Alter von 117 Tagen und wogen durchschnittlich 193,3g (Mittelwert) bei einer Standardabweichung von 21,1 g.

(Die Versuchstiere wurden zufällig ausgewählt; Herkunft und Haltungsbedingungen der Versuchstiere wie unter 2.1. beschrieben).

Am Versuchsende wurden den Versuchstieren in Äthernarkose

aus der Vena cava jeweils ca. 2-5 ml Blut abgenommen. Die einzelnen Blutproben wurden 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank warmgehalten und nach anschließender einstündiger Kühlung 10 Min. bei 2700 Umdrehungen/Min. zentrifugiert, das Serum als Überstand abpipettiert und tiefgefroren. Die Gallensäurenkonzentration in den Proben wurde gaschromatographisch bestimmt.

(Dr. Stellaard, II. Med. Klinik, Klinikum Großhadern der Universität München; zur verwendeten Analyse-methode vergleiche (67)).

3. ERGEBNISSE

3.1. Versuchsverlauf

3.1.1. Verendete und getötete Tiere

Innerhalb von fünf Tagen nach DMBA-Applikation verendeten in der Versuchsgruppe 11 und in der Kontrollgruppe 13 Tiere (beide Gruppen einschließlich der nachgeführten Tiere mit einer Gesamtausgangsstärke von je 45 Tieren); je ein weiteres Tier verendete nach 11 Tagen (Kontrollgruppe) und nach 18 Tagen (Versuchsgruppe).

Die Obduktion ergab bei allen Tieren ausgedehnte beidseitige Nebennierenrinden-Nekrosen (Tabelle 1, S. 35). Am 17. Versuchstag wurde ein Tier der Kontrollgruppe beim Käfigsäubern durch einen herabfallenden Käfig getötet.

Bis zum Versuchsende verstarben in der Versuchsgruppe zwei weitere Tiere, in der Kontrollgruppe fünf Tiere (Zeitpunkt und Diagnosen siehe Tabelle 2, S. 36).

Ein Tier der Versuchsgruppe und zwei Tiere der Kontrollgruppe wurden wegen großer, z.T. ausgedehnt ulzerierter Tumoren getötet (Tabelle 3, S. 37).

Bei der palpatorischen Untersuchung am 99. Versuchstag zeigten alle Versuchstiere in der Inguinalregion, z.T. auch axillär bis drei Millimeter im Durchmesser große subkutane Knötchen; zur Klärung des Befundes wurde ein Tier getötet und obduziert. Es fanden sich in den erwähnten Regionen hyperplastische, unspezifisch entzündlich veränderte Lymphknoten.

Dieser Befund wurde gedeutet als Reaktion auf einen nicht näher klassifizierbaren, unspezifischen Infekt. Die Tiere beider Gruppen zeigten während der gesamten Versuchsdauer keine Symptome für gastrointestinale Erkrankungen, insbesondere traten keine Durchfälle auf.

Tabelle 1: Todesfälle mit Nebennieren-Nekrosen.
Zeitpunkt des Auftretens und Anzahl
(Versuchs- und Kontrollgruppe ein-
schließlich der nachgeführten Tiere)

	Versuchstag	Anzahl verendeter Tiere	
Versuchsgruppe:	2	7	
	3	2	
	5	2	
	18	1	
		12	= 26,7 %
Kontrollgruppe:	2	10	
	3	1	
	4	1	
	5	1	
	11	1	
		14	= 31,1 %
Beide Gruppen	2.-18. Tag	26	= 28,9 %

Tabelle 2: Verendete Tiere (ausgenommen Todesfälle
durch Nebennierennekrosen)
Zeitpunkt und Todesursache

	Versuchstag	Todesursache
Versuchsgruppe	223	Malignes Lymphom
	273	Gehörgangs-Carcinom
Kontrollgruppe	17	Unfall
	87	Chron. Myelose
	208	Pneumonie
	212	diffuse Peritonitis granulomatöse Ent- zündung des Coecums
	291	Pneumonie
	298	Gehörgangs-Carcinom

Tabelle 3: Während des Versuchs getötete Tiere
Zeitpunkt und Diagnose

	Versuchstag	Diagnose
Versuchsgruppe:	91	unspezifische LK-Hyperplasie
	140	Mamma-Carcinom; Sarkom
Kontrollgruppe:	140	Mamma-Carcinom
	214	Mamma-Carcinom

3.1.2. Gewichtsverlauf

Bei Versuchsbeginn wogen die Ratten der Versuchsgruppe durchschnittlich 137,3 g (Mittelwert), die Tiere der Kontrollgruppe 126 g (Mittelwert), mit einer Schwankung um den Mittelwert (Standardabweichung) von 13,9 g in der Versuchsgruppe bzw. 14,4 g bei den Kontrolltieren.

In beiden Gruppen kam es zunächst zu einer raschen Gewichtszunahme, der in der graphischen Darstellung des Gewichtsverlaufs ein steiler Kurvenanstieg entspricht (Abbildung 6, S. 39).

Im weiteren Verlauf verlangsamte sich die Gewichtszunahme, die Mittelwerte beider Gruppen nahmen langsamer zu und näherten sich einander an.

Die Mittelwertunterschiede beider Gruppen in der zwanzigsten Woche und in der vierzigsten Woche waren bei Überprüfung mit dem doppelseitigen t-Test für unverbundene Stichproben (60) nicht signifikant.

3.2. Mamma-Neoplasien

3.2.1. Tumorausbeute

In der Versuchsgruppe entwickelten von 33 Überlebenden Tieren neun Ratten insgesamt 17 Mammatumoren, in der Kontrollgruppe (30 Überlebende Tiere) entstanden bei elf Tieren insgesamt 14 Mammatumoren.

Die Tumorausbeute setzt sich in der Versuchsgruppe zusammen aus 10 Mamma-Carcinomen, sechs Adenomen (davon ein Fibroadenom) und einem Sarkom, in der Kontrollgruppe aus sieben Carcinomen und sieben Adenomen, wobei zwei Fibroadenome mit eingeschlossen sind (Tabelle 4, S. 40 und Abbildung 7, S. 41).

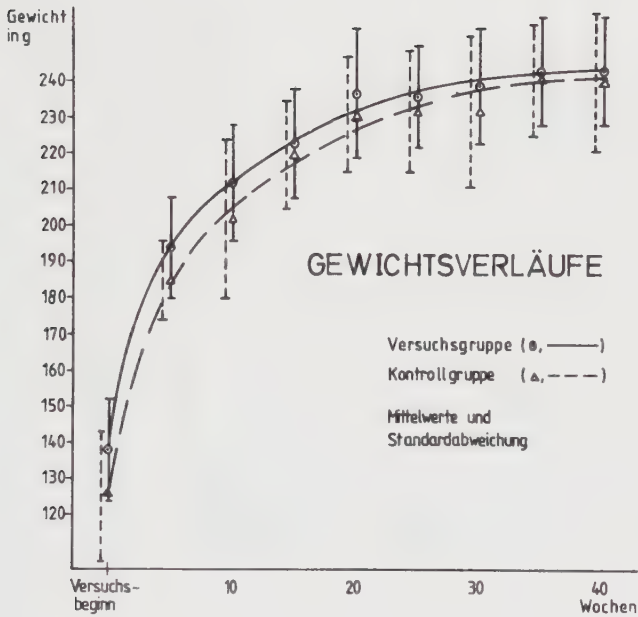


Abb.6: Gewichtsverläufe von Versuchsgruppe
(● , durchgezogene Linie)
und Kontrollgruppe
(Δ , gestrichelte Linie)
Mittelwerte und Standardabweichung

Tabelle 4:

Absolute Anzahl der Mamma-Tumoren, Anzahl der tumortragenden Tiere, mittlere Tumorzahl/Tier (bezogen auf alle Tiere einer Gruppe) und Tumorzahl/tumortragende Ratte in Versuchs- und Kontrollgruppe
n.s. = nicht signifikant (χ^2 -Test; (61))

	Tumoranzahl	Tumortragende Tiere		mittlere Tumorzahl/Tier bezogen auf alle Tiere einer Gruppe		Tumor/tumortragende Ratte	
	Versuchs-/Kontroll- gruppe	Versuchs-/Kontroll- gruppe		Versuchs-/Kontroll- gruppe		Versuchs-/Kontroll- gruppe	
Carcinome	10	7	9 = 27,3% 6 = 20 % n.s.	0,3	0,23	1,1	1,16
Adenome (einschl. Fibroadenome)	6	7	5 = 15,2% 5 = 16,7% n.s.	0,18	0,23	1,2	1,4
Adenome (ohne Fibroadenome)	5	5	4 = 12,1% 3 = 10 % n.s.	0,15	0,16	1,25	1,66
Sarkome	1	0	1 0 n.s.	0,03	0	-	-
Tumoren insgesamt	17	14	9 = 27,3% 11 = 36,7% n.s.	0,51	0,46	1,88	1,27

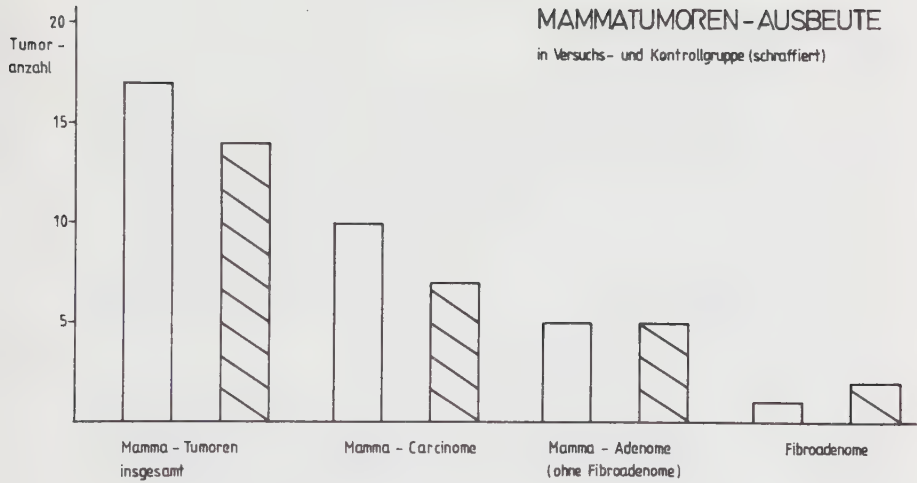


Abb.7: Mammatumoren-Ausbeute in Versuchsgruppe und Kontrollgruppe (schraffiert)

Die Anzahl tumortragender Tiere insgesamt sowie die Anzahl der Ratten mit malignen Mamma-Neoplasien (Carcinome und Sarkom), Mamma-Carcinomen und Adenomen war zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (χ^2 -Test; (61)).

Das Carcinom-Adenom-Verhältnis betrug (ohne Fibroadenome) in der Versuchsgruppe 2,25 und 2,0 in der Kontrollgruppe. Fünf Tiere der Versuchsgruppe gegenüber zwei Tieren der Kontrollgruppe trugen zwei oder mehr Mamma-Tumoren; je ein Tier aus beiden Gruppen wies mehr als ein Carcinom auf.

In der Versuchsgruppe traten bei vier Tieren mit Carcinom gleichzeitig Adenome auf, in der Kontrollgruppe war diese Kombination nicht nachzuweisen.

In der Versuchsgruppe trugen vier Tiere ein Adenom, ein Tier ein Fibroadenom; unter den Kontrolltieren fanden sich drei Ratten mit Mamma-Adenomen, zwei Tiere mit Fibroadenomen.

Je ein Tier in beiden Gruppen trug mehr als ein Adenom. Eine statistische Analyse mit dem χ^2 -Test (61) ergab bei den oben aufgeführten Befunden zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Schlüsselt man die entstandenen Mamma-Tumoren nach Dignität und histologischer Struktur auf, ergibt sich das in Tabelle 5, S. 43 dargestellte Bild.

Die Bewertung der Dignität der epithelialen Mamma-Tumoren der Ratte ist oft problematisch, da viele Carcinome hochdifferenziert sind und weder eine lokal destruierende Invasivität in das umliegende Gewebe zeigen noch lymphogene oder hämatogene Metastasen setzen.

Als Unterscheidungskriterien zu den Adenomen als den benignen epithelialen Mamma-Tumoren müssen strukturelle Unterschiede in den Tumoren herangezogen werden (z.B. Differenzierungsverlust mit Fehlen des läppchenartig gegliederten Aufbaus und irregulärer Anordnung der Drüsen), ebenso wie

Tabelle 5: Aufschlüsselung der Mamma-Tumoren nach
Dignität und histologischer Struktur

	<u>Inzidenz</u>	
	Versuchs-/Kontrollgruppe	
Benigne Mamma-Tumoren		
Adenome		
sezernierend	5	2
papillär-cystisch		2
Adenom mit atypischer		1
Epithelproliferation		
Fibroadenome	1	2
Maligne Mamma-Tumoren		
Carcinome		
(mit einer überwiegenden Komponente)		
reines Adeno-Carcinom		3
papilläres Carcinom	3	
cribriformes Carcinom	3	1
Comedo-Carcinom	1	
medulläres Carcinom		1
Carcinome		
(mit verschiedenen Komponenten)		
solid-cribriformes Carcinom		1
adeno-papilläres Carcinom	1	
solid-drüsiges Carcinom	1	
Carcinom mit atypischer Papillomatose	1	
Carcinom in Fibroadenom		1
Sarkom	1	

Veränderungen des Epithelverbandes (intraluminale Epithelbrückenbildungen, intraepitheliale Drüsenformationen) und zytologische Kriterien (Polymorphie und Polychromasie von Zytoplasma und Zellkernen, Kern-Zytoplasma-Relation, Nukleolenbildung, vermehrte und atypische Mitosen). Die Berücksichtigung aller dieser Parameter erlaubt für die meisten Tumoren die Dignitätsbestimmung mit ausreichender Sicherheit.

Die im folgenden verwendeten deskriptiven Bezeichnungen sollen das histologische Erscheinungsbild der untersuchten Tumoren wiedergeben; sie implizieren nicht Vermutungen über die Topohistogenese der Tumoren.

Die Mamma-Adenome hatten eine Größe zwischen 0,3 - 1,8 cm Durchmesser, waren annähernd kugelig oder eiförmig und durch eine Pseudokapsel aus verdrängtem Bindegewebe vom umliegenden Weichgewebe scharf abgegrenzt; die Konsistenz der Adenome war weich, die Schnittfläche weißlich-markig, z.T. von kleinen Zysten durchsetzt.

Mikroskopisch zeigen die Adenome dicht gepackte, meist läppchenförmig angeordnete Drüsenstrukturen mit schmalen bindegewebigem Stroma.

Die als sezernierenden Adenome bezeichneten Tumoren weisen weite alveoläre Strukturen auf, die z.T. mit homogenem oder tropfigem eosinophilen Sekret ausgefüllt sind; das Epithel bietet ein ruhiges Zellbild, wobei die Epithelzellen in einzelnen Tumorabschnitten große Zytoplasmakuolen aufweisen (Abbildung 8, S. 45).

In einem der Adenome mit ausgedehnter sezernierender Komponente finden sich in verbreitetes und faserreiches Stroma eingelagert atypische Drüsenstrukturen, z.T. mit intraepithelialen Drüsenbildungen; das mehrschichtige basophile Epithel zeigt große uniforme Kerne, vereinzelt mit Nukleolen. Dieser Tumor liegt offensichtlich im Grenzbereich zwischen Benignität und Malignität; wegen der re-

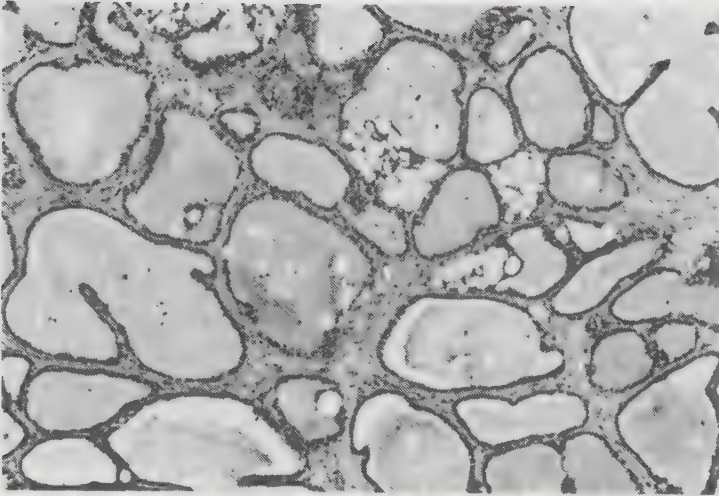


Abb.8: Sezernierendes Adenom (100 x)
Dilatierete Alveoli mit eosinophilem Sekret und
teilweise vakuolisiertem Epithel.

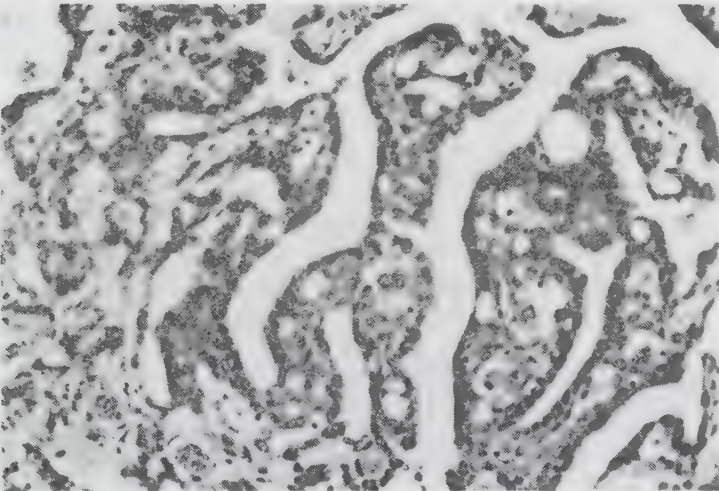


Abb.9: Papillär-zystisches Adenom (250 x)
Ein- bis zweischichtiges Epithel ohne Atypien
auf gefäßführenden Bindegewebsstielen.

lativ geringen Zellpolymorphie und fehlender mitotischer Aktivität wird der Tumor jedoch als eher benigne eingeschätzt und als Adenom mit atypischer Proliferation eingeordnet.

Unter die Adenome zählen weiter zwei bei demselben Versuchstier aufgetretene zystische Tumoren mit vorwiegend papillärem Wachstumsmuster, die dementsprechend als papillär-zystische Adenome bezeichnet wurden. Einschichtiges, meist kubisches, deutlich basophiles Epithel ragt hier auf baumartig verzweigten schmalen gefäßführenden Bindegewebsstielen in teilweise sekretgefüllte zystische Hohlräume hinein (Abbildung 9, S. 45).

Eine Mittelstellung zwischen den epithelialen und den mesenchymalen Mamma-Tumoren nimmt das Fibroadenom ein; hier handelt es sich um gemischte Tumoren mit mesenchymaler und epithelialer Komponente, wobei der mesenchymale Anteil gegenüber dem epithelialen deutlich dominiert. Die im Versuch entstandenen Fibroadenome waren kugelige, auch scheibenförmige Tumoren mit weißlicher Schnittfläche und einer Größe von 0,4 - 0,8 cm Durchmesser. Die Fibroadenome zeigen ein den epithelialen Gewebsanteil quantitativ weit überwiegendes, relativ zellarmes, sklerosiertes und teilweise hyalinisiertes Stroma, in das isolierte drüsige Strukturen mit engen Lumina und ein- bis zweischichtigem Epithel ohne gesteigerte Proliferation eingelagert sind (Abbildung 10, S. 47).

Bei einem dieser Tumoren sind die Drüsenlumina durch die Proliferation des Stromaanteils zu schmalen Spalten gepreßt, ähnlich dem intrakanalikulären Fibroadenom des Menschen (Abbildung 11, S. 47).

Die Mamma-Carcinome wiesen eine Größe zwischen 0,3 cm und 4,5 cm auf; sie waren z.T. abgekapselt und leicht präparierbar, bei anderen Carcinomen bestand bereits eine ausgedehnte Ulzeration der Haut und Infiltration des umgebenden Gewebes.

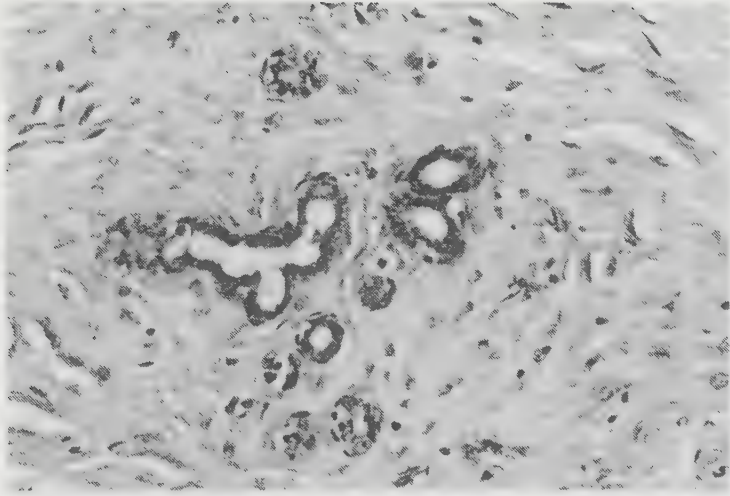


Abb.10: Perikanalikuläres Fibroadenom (100 x)
Zellarmes sklerosiertes Stroma mit einzelnen
auseinandergedrängten Drüsenlumina.

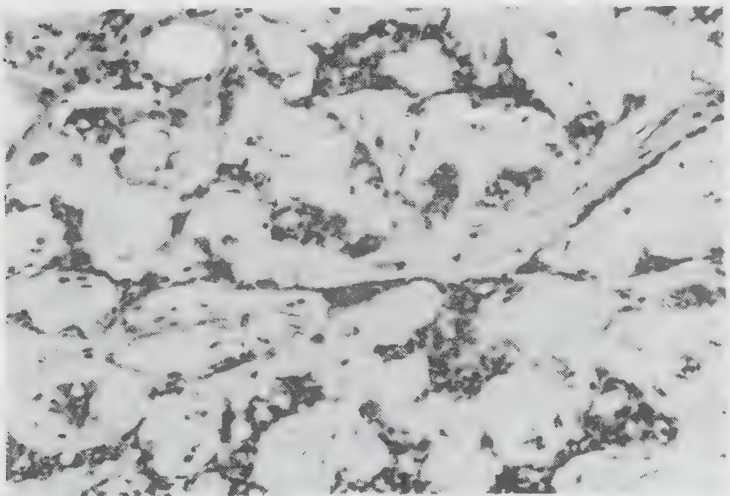


Abb.11: Intrakanalikuläres Fibroadenom (100 x)
Durch Proliferation des Stromaanteils zu schma-
len Spalten zusammengepreßte Drüsenlumina.

Die Carcinome erschienen knotig oder gelappt, von teils weicher, teils elastischer Konsistenz mit weißlicher oder grau-rötlicher Schnittfläche, die oft auch mit verflüssigten Nekrosen und hämorrhagischen Arealen durchsetzt war (Abbildung 12, S. 49 und Abbildung 13, S. 49).

Im feingeweblichen Aufbau zeigte ein Teil der Carcinome eine annähernd homogene Struktur mit gleichartigem histologischem Bild des gesamten Tumors, während der andere Teil der Carcinome sich aus verschiedenen differenzierten epithelialen Komponenten zusammensetzte.

Als Adeno-Carcinome ohne nähere Spezifizierung wurden Tumoren bezeichnet mit atypischen, ungeordnet dicht gelagerten tubulären Formationen mit unterschiedlich weiten, z.T. sekretgefüllten Lumina, die von mehrschichtigem Epithel ausgekleidet sind (Abbildung 14, S. 50).

Im Epithelverband treten teilweise intraluminale Brückenbildungen auf; die Zellen enthalten große, uniforme Kerne mit vergrößertem Chromatin und Nukleolen. Vereinzelt finden sich Mitosen. Im schmalen bindegewebigen Stroma liegt ein schütteres Infiltrat aus Entzündungszellen (vorwiegend Lymphozyten und Granulozyten). Größere Adeno-Carcinome waren ausgedehnt nekrotisch und verkalkt.

Bei den als papillären Carcinomen klassifizierten Neoplasien handelt es sich um parenchym- und zellreiche Tumoren mit zystischen Hohlräumen, in die sich fein- und grobgliedrige papilläre Formationen vorschieben. Die zahlreichen verzweigten gefäßführenden Bindegewebsstiele tragen ein ein- bis mehrschichtiges, meist kubisches Epithel; die Anfärbbarkeit des Zytoplasmas variiert von eosinophil nach basophil. Die Kerne sind vergrößert mit vergrößertem Chromatin. In den Tumoren finden sich reichlich Mitosen (Abbildung 15, S. 50).

Die cribriformen Carcinome sind charakterisiert durch ein siebartig durchbrochenes Muster der von Tumorzellen ausge-

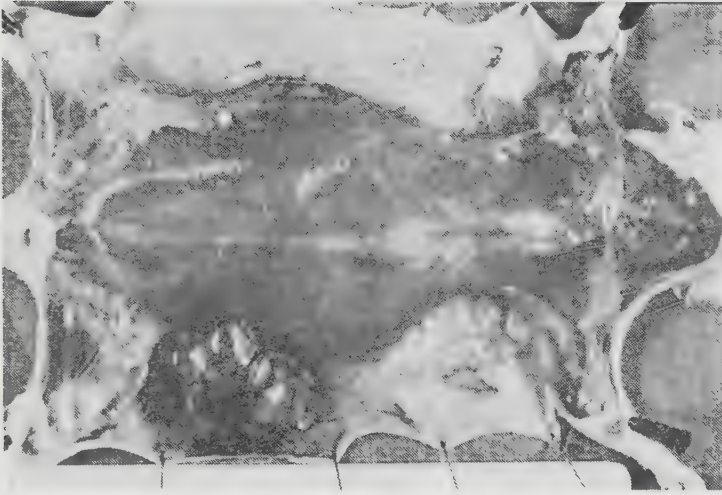


Abb.12: Derber Tumor (3,5 cm Ø) der Milchdrüse L₄ mit Pseudokapsel (histologisch: Adeno-Carcinom); an der Rumpfwand freipräparierte Milchdrüsen mit Mamillen.

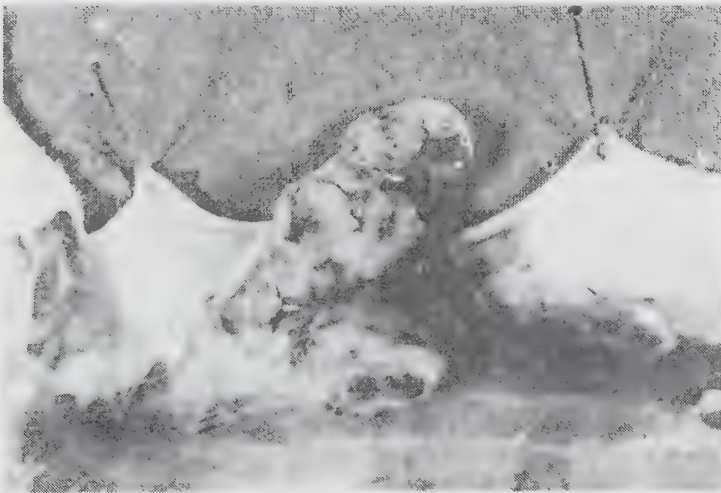


Abb.13: Gelappter, weicher Mammatumor (ca. 4 cm Ø) mit eingebluteter Nekrose.
(Histologisch: solid-cribriformes Carcinom).

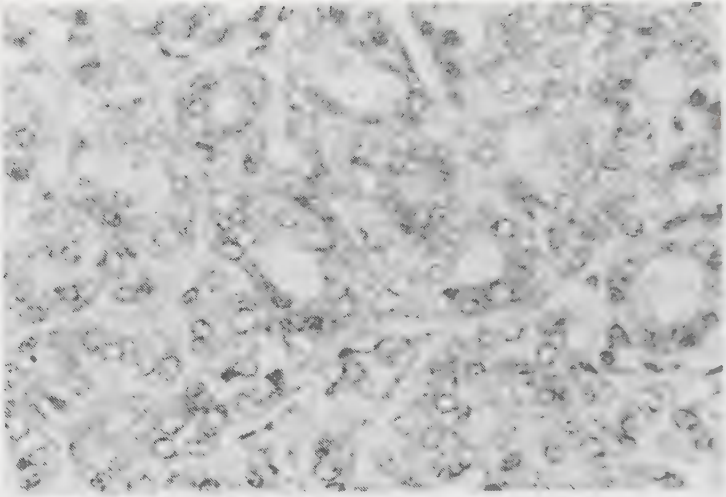


Abb.14: Adeno-Carcinom (400 x)

Dicht gedrängte, z.T. Rücken an Rücken gelagerte Drüsenlumina mit hochgradigen Epithelatyphen.

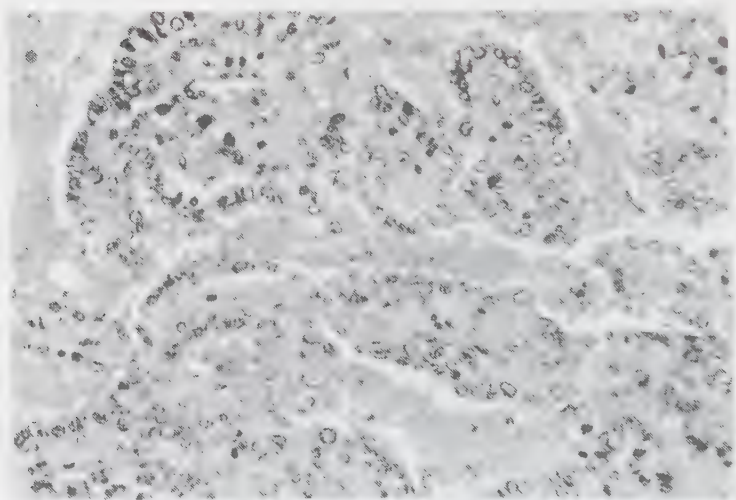


Abb.15: Papilläres Carcinom (250 x)

Ein- bis mehrschichtiges Epithel mit ausgeprägten Kernatypien auf schmalen Bindegewebsstielen.

füllten Hohlräume; die intraepithelialen Lumina sind oft ausgefüllt mit eosinophilem Sekret.

Einen ähnlichen histologischen Aufbau weisen die Comedo-Carcinome auf, bei denen die intrakanalikulären Tumorzellnester zentrale Nekrosepfropfe zeigen, wobei das erhaltene Epithel oft in cribriformem Baumuster gelagert ist (Abbildung 16, S. 52).

Als medulläres Carcinom wurde ein undifferenzierter Mamma-Tumor bezeichnet, dessen epithelial gelagerte Tumorzellen in breiten Platten und Bändern angeordnet sind, getrennt von schmalen Bindegewebssepten. Vereinzelt finden sich angedeutet auch drüsige Strukturen. Das Zytoplasma der Tumorzellen ist eosinophil, z.T. multivakuolär, die Zellgrenzen sind unscharf. Die Tumorzellen enthalten grobse Kerne mit erheblicher Polymorphie und Polychromasie; Mitosen sind jedoch selten. Als entzündliches Infiltrat sind spärlich Lymphozyten und Granulozyten eingestreut (Abbildung 17, S. 52).

Die oben aufgeführten Tumoren enthalten z.T. kleinere Areale mit unterschiedlich differenziertem Tumorgewebe; so finden sich z.B. tubuläre Strukturen im papillären Carcinom. Die Gewebskomponente, nach der der Tumor benannt ist, überwiegt aber in jedem Fall deutlich.

Drei der untersuchten Tumoren sind jedoch aus zwei unterschiedlichen histologischen Komponenten in annähernd gleichem Verhältnis zusammengesetzt, so daß diese Tumoren mit deskriptiven Doppelbezeichnungen gesondert aufgeführt werden (siehe Tabelle 5, S. 43).

Eine erwähnenswerte Besonderheit stellt ein in einem Fibroadenom entstandenes Carcinom dar (Abbildung 18, S. 53).

Die Überwiegend papillär, teils auch tubulär angeordneten Tumorzellen sind vom dichten faserreichen Stroma des Fibroadenoms umgeben; hier finden sich mehrere intrakanalikuläre Fibroadenomanteile mit regulär ausgebildetem Epithel ohne Atypien.

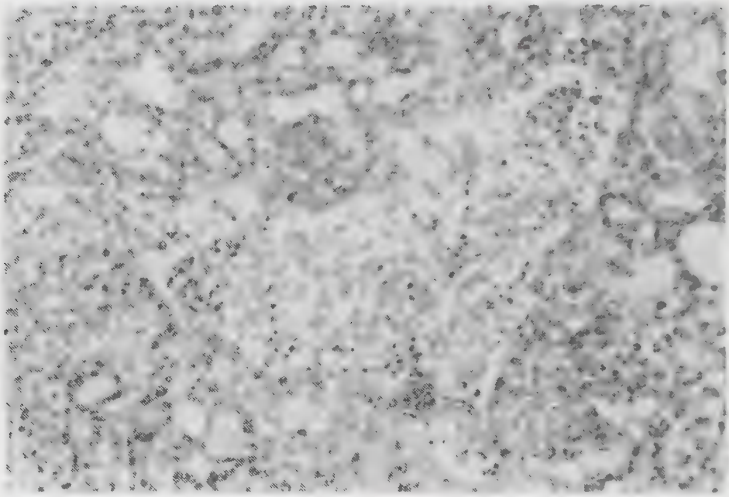


Abb.16: Comedo-Carcinom (250 x)

Zentraler Nekrosepfropf mit Zelltrümmern, umgeben von Tumorgewebe mit cribriformem, siebartig durchbrochenem Baumuster.

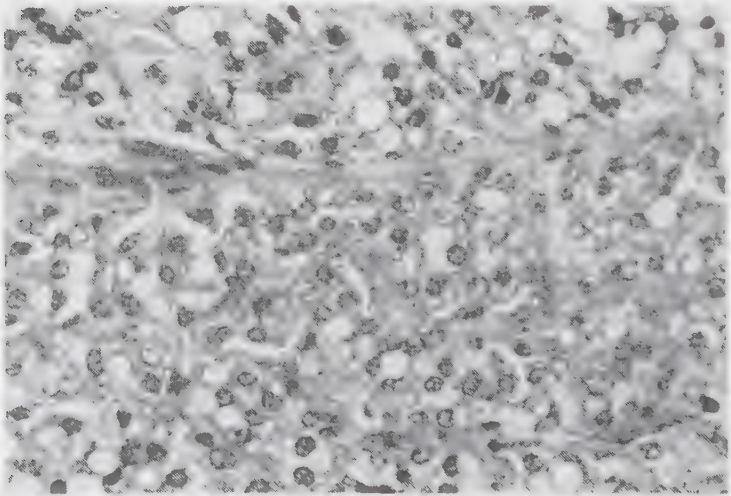


Abb.17: Medulläres Carcinom (400 x)

Undifferenziertes, stromaarmes Tumorgewebe aus z.T. vakuolisierten, epithelial gelagerten Tumorzellen mit deutlichen Kernatypien.

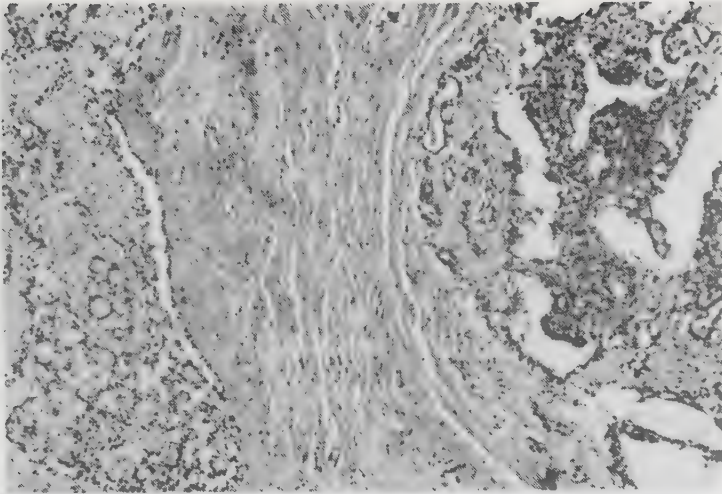


Abb.18: Intrakanalikuläres Fibroadenom (links) und papilläres Carcinom (rechts) innerhalb eines Mammatumors (100 x).

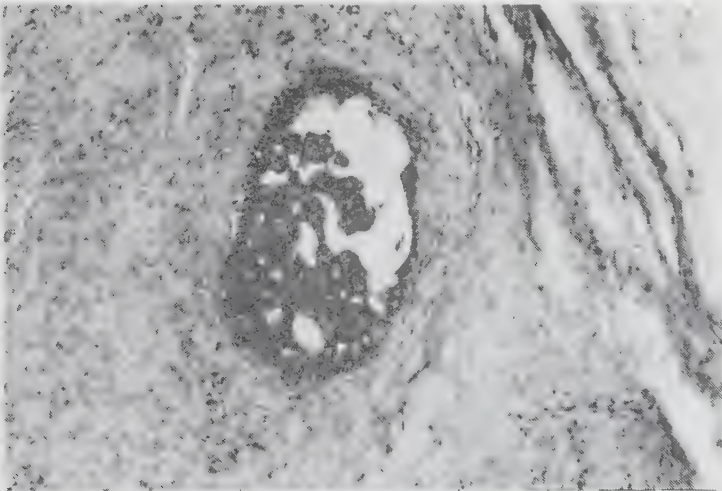


Abb.19: Papilläres Carcinom (250 x)

Der auffällig überwiegende Stromaanteil deutet möglicherweise auf ein vorbestehendes Fibroadenom hin.

Ein weiterer Tumor (Abbildung 19, S. 53), der als Carcinom gewertet wurde, besteht aus hochgradig atypischen, papillären Strukturen, die von einem breiten, faserreichen Stroma umgeben sind; hier handelt es sich möglicherweise auch um ein in einem Fibroadenom entstandenes Carcinom, wobei jedoch in diesem Fall keine epithelialen Adenomanteile mehr vorliegen.

Unter allen entstandenen Neoplasien fand sich ein einziger rein mesenchymaler Tumor; dieser Tumor wurde als Sarkom klassifiziert.

Makroskopisch handelte es sich um einen rasch wachsenden, weichen Knoten (Durchmesser bei der Sektion ca. 5,5 cm) mit fischfleischartiger weißlicher Schnittfläche, durchsetzt von unregelmäßig begrenzten Nekrosearealen.

Histologisch imponiert der hohe Zellreichtum, die längs-ovalen Zellkerne sind fischgrätenartig angeordnet, die Zellen zu durchflochtenen Bündeln zusammengelagert. Die Kerne sind auffällig durch ausgeprägte Form- und Größenschwankungen, daneben liegen zahlreiche, z.T. atypische Mitosen vor.

Andere Areale des Tumors lassen kein Ordnungsmuster mehr erkennen; die Tumorzellen sind hier hochgradig polymorph; daneben imponieren zahlreiche Tumorriesenzellen mit mehreren bizarren Kernen (Abbildung 20 und 21, S. 55).

Der Tumor, der in den besser differenzierten gebündelten Arealen eine spärliche Kollagenfaserbildung zeigt, ist wohl am ehesten als Fibrosarkom zu klassifizieren.

3.2.2. Tumorinduktionszeit

Als Tumorinduktionszeit wird der Zeitraum vom Versuchsbeginn bis zum Auftreten palpabler Mamma-Tumoren bezeichnet.

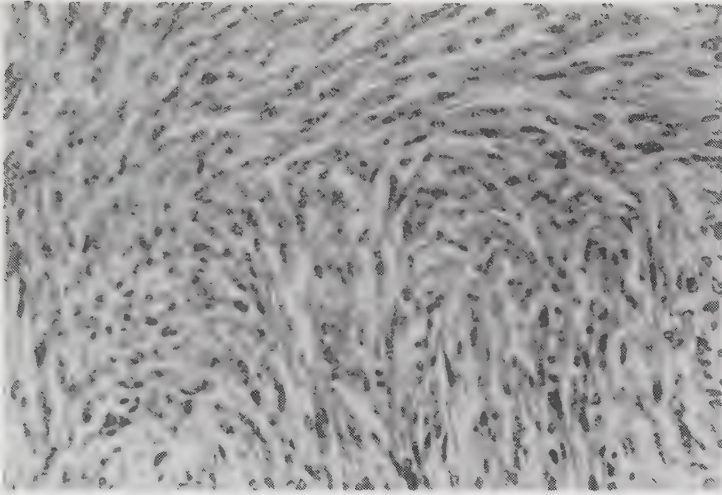


Abb.20: Fibrosarkom (250 x)
Fischzugartig angeordnete, zu durchflochtenen
Bündeln gelagerte, spindelige mesenchymale
Tumorzellen.

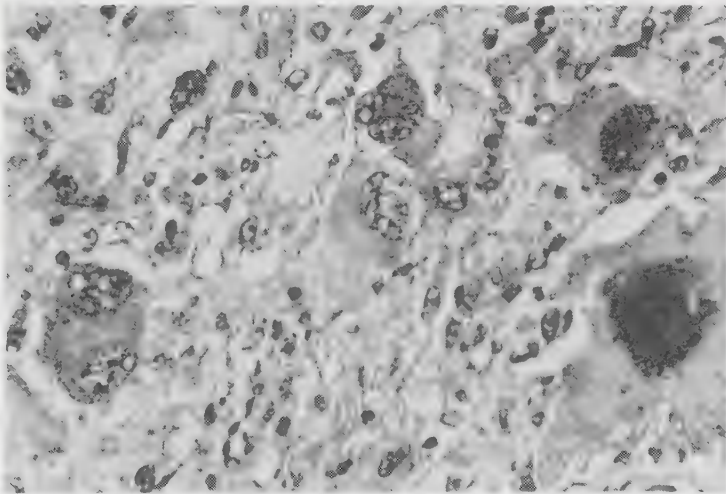


Abb.21: Fibrosarkom (400 x)
Hochgradige Zell- und Kernpolymorphie;
zahlreiche bizarre Tumorriesenzellen.

Die Lokalisation getasteter Tumoren wurde protokolliert, um eine eindeutige Zuordnung der nach der Obduktion gewonnenen Histologie zu den einzelnen getasteten Veränderungen sicherzustellen.

Die Induktionszeiten berücksichtigen nicht die erst nach der Obduktion mikroskopisch entdeckten Mikrotumoren.

Von den insgesamt zehn Carcinomen der Versuchsgruppe waren sieben tastbar; bei den Kontrollen konnten von insgesamt sieben Carcinomen fünf palpiert werden.

In der Versuchsgruppe waren bis zum Versuchsende keine tastbaren Adenome aufgetreten, in der Kontrollgruppe entstanden dagegen drei palpable Adenome (von insgesamt sieben Adenomen).

Die mittleren Induktionszeiten für die im Versuch aufgetretenen Carcinome und Adenome sind bei den Kontrolltieren kürzer als bei den Tieren der Versuchsgruppe; die mittlere Induktionszeit für die entstandenen Carcinome ist kürzer als für die Adenome (Abbildung 22, S. 57, Tabelle 6, S. 58). Bei der Interpretation muß berücksichtigt werden, daß die geringen Tumorzahlen die Aussagekraft weitgehend abschwächen.

3.2.3. Tumorgrößen und Tumorwachstumsgeschwindigkeit

Die durchschnittlichen Tumorgrößen und Wachstumsgeschwindigkeiten für die palpablen Tumoren, bei denen während des Versuchs bis zur Obduktion am Versuchsende der Verlauf beobachtet werden konnte, sind in Tabelle 7, S. 59 dargestellt. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird verstanden als gemittelte Größenzunahme der getasteten Tumoren in der Zeiteinheit und berücksichtigt nicht proliferationskinetische Besonderheiten wie die exponentielle Größenzunahme zu Beginn und die Verlangsamung des Wachstums im weiteren Verlauf der Tumor-entstehung.

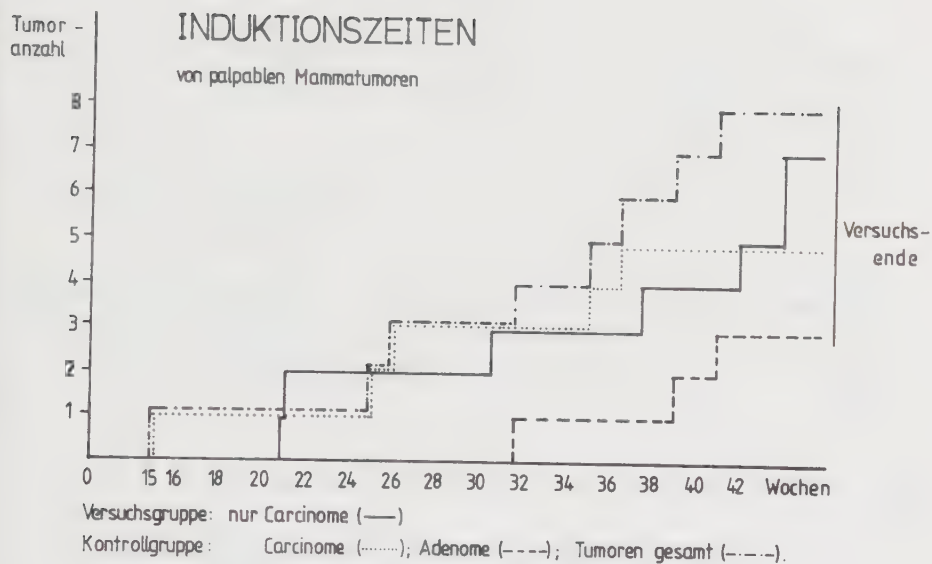


Abb.22: Induktionszeiten der (palpablen) Mamma-Tumoren in Versuchs- und Kontrollgruppen.

Tabelle 6: Mittlere Induktionszeiten für palpable
Mamma-Tumoren in Versuchs- und Kontroll-
gruppe

	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
Carcinome	238,3 Tage $\bar{G} = 64,8$	194,2 Tage $\bar{G} = 49,8$
Adenome	keine tastbaren Adenome	261,7 Tage $\bar{G} = 28$

Tabelle 7: Palpable Mamma-Tumoren
Durchmesser am Versuchsende und
Wachstumsgeschwindigkeit

		Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
Carcinome:	Durchmesser (Mittelwert; Min.-Max.)	2,7 cm (1,0-4,5cm)	2,9 cm (2,0-4,0cm)
	Wachstums- geschwindig- keit (Mittelwert)	0,45 cm/Woche	0,43 cm/Woche
Adenome:	Durchmesser		1,2 cm (0,4-1,8cm)
	Wachstums- geschwindig- keit	(keine tastbaren Adenome)	0,2 cm/Woche
Fibroadenom:	Durchmesser		2,0 cm nur
	Wachstums- geschwindig- keit	(keine tastbaren Fibroadenome)	0,1 cm/Woche ein Tumor
Sarkom:	Durchmesser	5,5 cm	nur
	Wachstums- geschwindig- keit	1,3 cm/Woche	ein (keine Sarkome aufgetreten) Tumor

Für die Mamma-Carcinome ergaben sich in beiden Gruppen für Tumordurchmesser und Wachstumsgeschwindigkeiten Werte in der gleichen Größenordnung.

Mamma-Adenome konnten während des Versuchs nur in der Kontrollgruppe palpiert werden; sie waren kleiner und wuchsen langsamer als die Carcinome.

In der Kontrollgruppe wurde ein sehr langsam wachsendes Fibroadenom beobachtet, in dem sich mikroskopisch nach der Obduktion am Versuchsende ein Mikrocarcinom nachweisen ließ.

Das in der Versuchsgruppe aufgetretene Sarkom wuchs sehr rasch und erreichte eine Größe von 5,5 cm Durchmesser. Die Mamma-Tumoren, die erst bei der Obduktion am Versuchsende festgestellt wurden, hatten eine durchschnittliche Größe von 0,3 - 0,9 cm Durchmesser.

3.2.4. Lokalisation der Mamma-Tumoren

Eine Übersicht über die Lokalisation der Mamma-Tumoren gibt die Tabelle 8, S. 61, in der die Anzahl der Tumoren in der oberen und unteren, rechten und linken Körperhälfte sowie in den vier Quadranten angegeben ist.

In einem Quadranten sind jeweils drei Milchdrüsen zusammengezogen, wobei $R_1 - R_3$ und $R_4 - R_6$ die axillären bzw. inguinalen Milchdrüsen der rechten Körperhälfte umfassen und $L_1 - L_3$ bzw. $L_4 - L_6$ analog die Mammæ der linken Körperhälfte.

Weder Carcinome noch Adenome noch Carcinome und Adenome zusammengenommen zeigten in beiden Gruppen eine statistisch signifikante unterschiedliche Lokalisation (χ^2 -Test, (61)).

Tabelle 8: Lokalisation der Mamma-Tumoren
(Carcinome und Adenome)

	Versuchsgruppe				Kontrollgruppe	
<u>Carcinome</u>	R ₁₋₃	1	4	L ₁₋₃	1	2
	R ₄₋₆	3	2	L ₄₋₆	1	3
	rechts : links			rechts : links		
	4 : 6			2 : 5		
	oben : unten			oben : unten		
	5 : 5			3 : 4		
<u>Adenome</u>		0	2		2	1
		1	2		2	0
	rechts : links			rechts : links		
	1 : 4			4 : 1		
	oben : unten			oben : unten		
	2 : 3			3 : 2		

3.2.5. Metastasierung

Hämatogene Metastasen waren bei keinem Tier mit Mamma-Tumor nachzuweisen.

Eine Ratte der Versuchsgruppe mit einem ulzerierten, cribriformen Mamma-Carcinom von 4,5 cm Durchmesser im Bereich der kaudalen inguinalen Milchdrüse (R_6) wies in einem parailiakalen Lymphknoten rechts eine Lymphknotenmetastase von 1,5 cm Durchmesser auf.

Weitere lymphogene Metastasen fanden sich weder bei diesem Tier noch bei den anderen Tieren mit Mamma-Tumoren.

3.3. Extramammäre Neoplasien

Neben den Mamma-Tumoren entstanden als weitere Neoplasien Tumoren der Haut bzw. der Hautanhangsgebilde mit bevorzugter Lokalisation im äußeren Gehörgang sowie ein Darmtumor und je eine Neoplasie des lymphatischen und des hämatopoietischen Systems (Tabelle 9, S. 63).

Bei den malignen extramammären Neubildungen standen bei beiden Gruppen Plattenepithel-Carcinome des äußeren Gehörgangs im Vordergrund mit einer Inzidenz von fünf Carcinomen in der Versuchsgruppe bei drei Carcinomen in der Kontrollgruppe.

Diese Tumoren erreichten eine Größe von bis zu fünf Zentimetern Durchmesser und zeigten z.T. ausgedehnte Hautulzerationen und in einigen Fällen eine Arrosion der Schädelknochen.

Histologisch wurden die Tumoren als infiltrierende, unterschiedlich ausdifferenzierte, z.T. verhornende Plattenepithel-Carcinome eingeordnet.

Eine Metastasierung konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Extramammäre Tumoren bzw. Neoplasien

	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
Maligne:	Plattenepithel-Carcinome	
	äußerer Gehörgang:	
	Anzahl : 5	Anzahl : 3
	Malignes Lymphom	Myelose
		Colon-Carcinom
Dignität fraglich:	Gehörgangs-Tumoren mit	
	mäßiggradig atypischem Plattenepithel:	
	Anzahl : 1	Anzahl : 1
Benigne:	Fibrom der Haut	
	Tumor der Haut- anhangsgebilde (wohl Trichoepi- theliom)	

Ein Tier der Versuchsgruppe verstarb am 86. Versuchstag an einem malignen Lymphom; die Sektion ergab ausgedehnte, verbackene Lymphknotenpakete vor allem zervikal, auch retrosternal und an anderen Lymphknotenstationen; daneben bestand eine Hepatosplenomegalie.

Die histologischen Präparate zeigten Lymphknoten mit aufgehobener Struktur, dichten Infiltraten aus zytoplasma-losen Zellen mit chromatindichten, runden, kleinen Kernen. Während Milz und Knochenmark diffus infiltriert waren, fand sich in der Leber eine periportale Infiltration entsprechend dem Bild einer chronisch lymphatischen Leukämie. Die Obduktion eines am 223. Versuchstag verendeten Tieres aus der Kontrollgruppe ergab die Diagnose einer Myelose. Knochenmark, Milz und Leber waren diffus durchsetzt von unterschiedlich ausgereiften Zellen der Granulozytopoese, am ehesten entsprechend einer chronischen myeloischen Leukämie.

Bei der Sektion am Versuchsende fand sich bei einem weiteren Kontrolltier ein mittel- bis hochdifferenziertes Adeno-Carcinom des Colons von ca. 4 cm Durchmesser, aufgebaut aus atypischen, die Muscularis propria tief infiltrierenden hyperchromatischen Drüsenformationen. Metastasen waren nicht nachweisbar.

In beiden Gruppen kam je ein Gehörgangstumor mit mäßiggradig dysplastischem Plattenepithel zur Beobachtung, der wegen fehlender sicherer Invasivität nicht als maligne eingestuft wurde.

An gutartigen Neubildungen wurden bei den Kontrolltieren ein Fibrom der Haut (0,6 cm Durchmesser) sowie ein Tumor der Hautanhangsgebilde beobachtet, der am ehesten einem Trichoepitheliom entspricht (0,9 cm Durchmesser).

3.4. Toxizität von DMBA

Nach Applikation des Karzinogens DMBA verendeten in der Versuchsgruppe innerhalb von 18 Tagen 12 Tiere und in der Kontrollgruppe innerhalb von 11 Tagen 14 Tiere (Tabelle 1, S. 35) an beidseitigen Nebennierenrinden-Nekrosen (Abbildung 23, S. 66).

Die Anzahl dieser akut verstorbenen Tiere in beiden Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied (χ^2 -Test; (61)).

Bei der Obduktion der Tiere am Versuchsende fanden sich bei sechs Tieren der Versuchsgruppe und 13 Tieren der Kontrollgruppe Verkalkungen unterschiedlicher Ausdehnung in den Nebennieren (Abbildung 24, S. 66) als Folgezustand einer länger zurückliegenden Schädigung der Nebennieren mit teilweiser Nekrose. Der Unterschied in der Anzahl der betroffenen Tiere in beiden Gruppen ist statistisch signifikant (χ^2 -Test (61), $p = 0,05$). Hier muß allerdings bedacht werden, daß zwar bei jedem Tier die Nebennieren histologisch untersucht wurden, die Organe jedoch nicht vollständig in Serienschnitten aufgearbeitet wurden, so daß kleinere Verkalkungsherde der Entdeckung möglicherweise entgangen sind.

Das mittlere Ausgangsgewicht der Tiere mit akuten und chronischen Nebennierenschäden ist nicht signifikant unterschiedlich zum mittleren Ausgangsgewicht der übrigen Tiere der jeweiligen Gruppe (t-Test; (60)).

An den übrigen untersuchten Organen, insbesondere der Leber, waren in beiden Gruppen keine morphologischen Zeichen toxischer Schädigung nachweisbar.

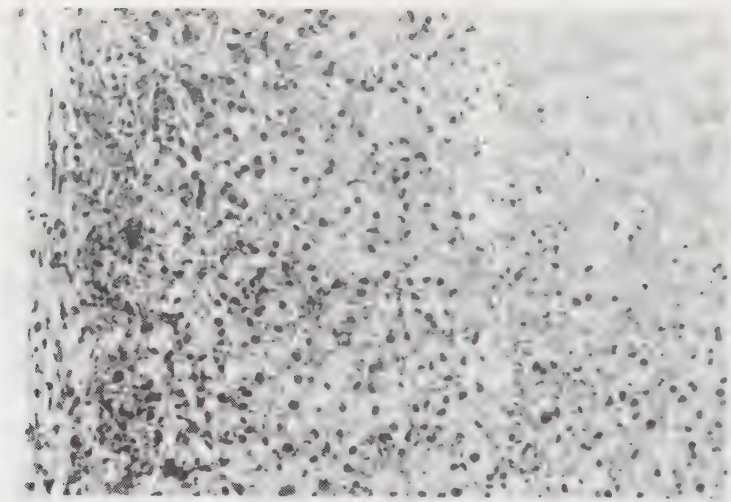


Abb.23: Akute Nebennierenrinden-Nekrose (250 x)
Ausgedehnte frische Nekrose der Zona faszikulata
(rechts); Zona glomerulosa (links) weitgehend
erhalten mit ausgeprägter Hyperämie.

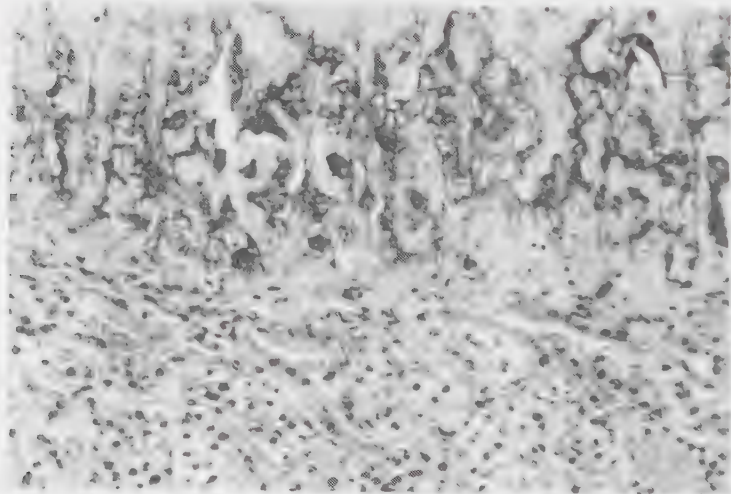


Abb.24: Alte Nebennierenrinden-Nekrosen (250 x)
Strangförmig angeordnete Verkalkung der
Zona faszikulata (obere Bildhälfte).

3.5. Gallensäuren-Konzentration und prozentuale Zusammensetzung der Gallensäuren im peripheren venösen Blut

Die Messung der Gallensäuren-Serumspiegel im peripheren venösen Blut (entsprechend der im Abschnitt 2.4., S. 32 beschriebenen Versuchsanordnung) bei Ratten, die chenodesoxycholsäurehaltiges Futter erhielten sowie bei den Kontrolltieren, die mit gallensäurefreier Standarddiät versorgt wurden, ergab das in Tabelle 10, S. 68 dargestellte Bild.

Die absoluten Werte der Serum-Konzentration zeigen bei den Tieren beider Gruppen ausgeprägte Schwankungen; bildet man jedoch für die männlichen und weiblichen Ratten einen zusammenfassenden Mittelwert, so findet sich bei den Tieren mit chenodesoxycholsäurehaltigem Futter nahezu eine Vervierfachung der Serumkonzentration der Chenodesoxycholsäure gegenüber den Kontrollen, die gallensäurefreies Futter erhielten.

Die prozentuale Zusammensetzung der Gallensäuren im Serum ist offensichtlich wesentlich geringeren Schwankungen ausgesetzt (Tabelle 11, S. 69); der mittlere prozentuale Anteil der Chenodesoxycholsäure ist bei den Tieren, die diese Gallensäure im Futter aufnahmen, nahezu doppelt so groß wie bei den Kontrolltieren.

Wegen der geringen Anzahl der Tiere wurden die Daten keiner statistischen Analyse unterworfen.

Tabelle 10: Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) der Gallensäuren im peripheren Blut der Ratte bei Standarddiät (Kontrollen) und chenodesoxycholsäurehaltigem Futter für je drei weibliche und drei männliche Versuchstiere

	Chenodesoxy- cholsäure	Cholsäure	Desoxychol- säure	Hyodesoxy- cholsäure
<u>Standarddiät</u>				
weiblich	0,3	0,8	0,1	0,6
	4,7	8,2	2,4	1,4
	1,6	3,8	0,8	1,5
männlich	0,5	4,8	0,8	2,2
	2,2	10,9	2,8	3,8
	6,8	36,7	3,8	18,0
Mittelwert mit				
Standardabweichung	$2,7 \pm 2,6$	$10,9 \pm 13,1$	$1,8 \pm 1,4$	$4,6 \pm 6,7$
<u>Futter mit</u>				
<u>Chenodesoxy-</u>				
<u>cholsäure</u>				
weiblich	2,6	3,6	0,8	2,3
	51,8	56,1	5,9	19,1
	1,0	1,0	0,3	1,3
männlich	7,5	9,8	4,6	7,2
	6,5	9,8	2,9	3,4
	2,3	5,7	1,7	2,6
Mittelwert mit				
Standardabweichung	$11,9 \pm 19,7$	$19,3 \pm 20,7$	$2,7 \pm 2,2$	$6,0 \pm 8,1$

Tabelle 11: Prozentuale Zusammensetzung der Gallensäuren im peripheren Blut der Ratte bei Standarddiät (Kontrollen) und Verfütterung von Chenodesoxycholsäure für je drei weibliche und drei männliche Versuchstiere

	Chenodesoxy- cholsäure	Cholsäure	Desoxychol- säure	Hyodesoxy- cholsäure
<u>Standarddiät</u>				
weiblich	16,7	44,4	5,6	33,3
	28,1	49,1	14,4	8,4
	20,8	49,4	10,4	19,5
männlich	6,0	57,8	9,6	26,5
	11,2	55,3	14,2	19,3
	10,4	56,2	5,8	27,6
Mittelwert mit Standardabweichung	15,5 ± 8,0	52,0 ± 5,2	10,0 ± 3,9	22,4 ± 8,7
<u>Futter mit Chenodesoxy- cholsäure</u>				
weiblich	28,0	38,7	8,6	24,7
	39,0	42,2	4,4	14,4
	27,8	27,8	8,3	36,1
männlich	25,8	33,7	15,8	24,7
	28,8	43,4	12,8	15,0
	18,7	46,3	13,8	21,1
Mittelwert mit Standardabweichung	28,0 ± 6,5	38,7 ± 6,9	10,6 ± 4,2	22,7 ± 8,0

4. DISKUSSION

4.1. Chenodesoxycholsäure-Verfütterung: Serumspiegel, toxische Wirkungen, Gewichtsverlauf

Die Aufnahme von Chenodesoxycholsäure mit dem Futter führt bei den als Versuchstiere verwendeten Wistar-Ratten zu einem ausgeprägten Anstieg der Serumkonzentration von Chenodesoxycholsäure im peripheren venösen Blut (Tabelle 10, S. 68), wobei die deutliche Schwankung der Meßwerte möglicherweise auf nicht kontrollierte Einflüsse wie z.B. unterschiedliches Freßverhalten zurückzuführen ist.

Die prozentuale Zusammensetzung der Gallensäuren im peripheren Blut (Tabelle 10, S. 69) gibt offenbar für den Effekt der Chenodesoxycholsäure-Verfütterung ein zuverlässigeres Maß mit geringeren Abweichungen vom Mittelwert; der prozentuale Anteil der Chenodesoxycholsäure an der Gesamtmenge der Gallensäuren im peripheren Blut nimmt jedenfalls nach Chenodesoxycholsäure-Verfütterung deutlich zu.

Es liegen zahlreiche Untersuchungen vor über die Gallensäuren-Konzentration und Zusammensetzung in der Galle, im Pfortaderblut und in den Fäzes von Ratten, wobei jedoch keine Angaben über die peripheren Serumspiegel der Gallensäuren gemacht werden.

Eine Diskussion der vorliegenden eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren wäre ohnehin auch nur dann sinnvoll, wenn durch die Anwendung derselben Analyse- methode und einer entsprechenden Konzentration der Chenodesoxycholsäure im Futter die Vergleichbarkeit der Angaben gewährleistet wäre.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung läßt sich ableiten, daß die Grundvoraussetzung für eine tumormpromovierende Wirkung der Chenodesoxycholsäure bei

der Mamma-Carcinogenese gegeben ist: die Chenodesoxycholsäure ist im großen Kreislauf im Serum nachweisbar und die Serum-Konzentration steigt bei oraler Aufnahme dieser Gallensäure an.

Die Messung der Chenodesoxycholsäure wurde zwar im peripheren venösen Blut vorgenommen, Untersuchungen am Menschen zeigten jedoch, daß die Gallensäuren-Konzentration im arteriellen und peripheren venösen Blut annähernd identisch ist, da eine Clearance der Gallensäuren offenbar nur in der Leber stattfindet (2).

Auch beim Menschen steigt nach oraler Aufnahme von Chenodesoxycholsäure die Konzentration dieser Gallensäure im peripheren venösen Blut an; derselbe Effekt tritt auf bei einer gesteigerten Zirkulation der Gallensäuren unter cholecystokinin-bedingter Dauerkontraktion der Gallenblase (20).

Cheno- und Ursodesoxycholsäure werden beim Menschen zur chemischen Litholyse von Gallensteinen oral appliziert. Dabei kann es zu unerwünschten Nebenwirkungen mit Störungen der Leberfunktion kommen, die unter Chenodesoxycholsäure-Therapie stärker ausgeprägt sind als unter Ursodesoxycholsäure-Gabe.

Die Wirkung oral applizierter Chenodesoxycholsäure auf die Leber ist im Tierexperiment an der Ratte untersucht worden. Dabei wurden als lichtmikroskopisch nachweisbare morphologische Leberveränderungen beobachtet eine Verfettung der Hepatozyten, Einzelzellnekrosen sowie als Zeichen verstärkter Regeneration des Leberparenchyms Mitosen und eine Kernpolymorphie der Hepatozyten; daneben fanden sich portal entzündliche Infiltrate, eine Gallengangsproliferation und schließlich eine Fibrose des Leberparenchyms (43; 63).

Der Schweregrad der Leberschädigung ist dosisabhängig (43).

Für eine lichtmikroskopisch erkennbare Schädigung der Leber der Ratte ist eine Tagesdosis Chenodesoxycholsäure von mehr als 90 mg/kg Körpergewicht notwendig; diese Tagesdosis entspricht etwa der beim Menschen für die Litholyse von Gallensteinen notwendigen Dosis von 15 mg/kg KG. Krankheitserscheinungen lassen sich bei den Ratten erst bei einer Tagesdosis von 250 mg/kg KG feststellen, eine Tagesdosis von 1000 mg/kg KG ist letal (43).

In der vorliegenden Untersuchung lag die maximale Tagesdosis bereits zu Versuchsbeginn mit ca. 90 mg/kg Körpergewicht deutlich unterhalb des toxischen Bereichs.

Bei der histologischen Auswertung am Versuchsende fanden sich zwar bei einigen Tieren in der Leber unregelmässig verteilte gemischt entzündliche portale Infiltrate, jedoch waren in keinem Fall eine portale oder septale Fibrose, eine Gallengangsproliferation oder eine gestiegene Proliferation der Hepatozyten nachweisbar. Die Chenodesoxycholsäure-Gabe führte also bei der gewählten Dosierung nicht zu morphologisch faßbaren Leberschäden bei den Versuchstieren.

Ebenfalls ergab sich für durch Gallensäure-Gabe bedingte funktionelle Störungen kein Anhalt, insbesondere wurden keine Durchfälle beobachtet.

Für eine normale Entwicklung der Versuchstiere ohne Gedeihstörungen spricht auch der Gewichtsverlauf; nach sieben Lebensmonaten hatten die Versuchstiere mit durchschnittlich ca. 250 g Körpergewicht ein für dieses Lebensalter normales Gewicht erreicht (32).

Zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung.

4.2. DMBA: Toxische Wirkungen

Nebennierenrinden-Nekrosen bei der Ratte, die innerhalb weniger Tage zum Tod der Versuchstiere führen können, sind als toxischer Effekt des DMBA bekannt.

Der Schweregrad der toxischen Wirkung des DMBA ist abhängig vom verwendeten Tierstamm sowie der applizierten Dosis; eine auf mehrere Verabreichungen aufgeteilte Gesamtdosis wirkt dabei weniger toxisch als die gleiche Gesamtdosis bei einmaliger Gabe.

Für Sprague-Dawley-Ratten liegen detaillierte Untersuchungen der Beziehung von Dosis und toxischer Wirkung vor, für Wistar-Ratten sind die Angaben spärlich (Tabelle 12, S. 74); bei beiden Tierstämmen sind die Befunde verschiedener Untersucher z.T. widersprüchlich.

Während bei der in der vorliegenden Untersuchung angewandten Versuchsanordnung mit einmaliger oraler Gabe von 20 mg DMBA insgesamt 28,9 % der Versuchstiere (Versuchs- und Kontrollgruppe zusammengenommen) verendeten, berichtet eine andere Untersuchung (49) bei derselben Dosis DMBA beim selben Tierstamm keine Ausfälle.

Auch bei Sprague-Dawley-Ratten schwanken die Angaben über Ausfälle nach oraler Gabe von 20 mg DMBA zwischen 0 % (33, 38) und 38 % (49). Bei einer Schwankungsbreite dieser Größenordnung drängt sich die Vermutung auf, daß auch innerhalb desselben Stammes bei den Versuchstieren in den einzelnen Labors genetisch bedingte metabolische Unterschiede vorliegen, die die Empfindlichkeit gegenüber DMBA bestimmen; Aussagen über die Toxizität von DMBA bei einzelnen Rattenstämmen können daher nur zur groben Orientierung dienen.

In der vorliegenden Untersuchung war die akute toxische Wirkung des DMBA in der Versuchsgruppe (26,7 % verendete

Tabelle 12:

Toxische Wirkung des DMBA in Abhängigkeit von Dosis und Tierstamm:
Literaturvergleich und eigene Ergebnisse
(weibliche Ratten; Alter bei Applikation ca. 50 Tage)

		V E R E N D E T E T I E R E					
		Sprague-Dawley		Wistar			
Dosis DMBA (einmalige orale Appli- kation)		HAMILTON (33)	HUGGINS (38)	POLLARD (49)	KOVACS (41)	POLLARD (49)	KOVACS (41)
		et al.	et.al.				
20 mg	0 %	0 %		38 %		0 %	28,9 %
30 mg	5 %						(kontroll- und Versuchsgrupp zusammen)
40 mg	20 %						
50 mg	35 %	100 %			"einige"		
60 mg	55 %					ca. 66 %	
70 mg	55 %						

eigene Unter-
suchung

Tiere) und der Kontrollgruppe (31,1 % verendete Tiere) nicht signifikant unterschiedlich; ein Einfluß der Gallensäure auf Aufnahme und Metabolismus des DMBA ist auch nicht wahrscheinlich, da die Chenodesoxycholsäure erst nach DMBA-Applikation verabreicht wurde.

Toxische Nebennierenrinden-Schädigungen, die nicht zum Tod der Versuchstiere führen, werden in der Literatur bei einem hohem Prozentsatz der Versuchstiere berichtet: so fanden sich bei Sprague-Dawley-Ratten in einer Untersuchung (80) nach Applikation von 20 mg DMBA am dritten Tag bei 83 % der Versuchstiere Nekrosen in der Nebennierenrinde, in einer anderen Untersuchung (18) konnten nach Gabe von 30 mg DMBA am dritten und vierten Versuchstag bei 70 % der Versuchstiere Nekrosen in den Nebennieren nachgewiesen werden.

Die Überlebenden Tiere zeigen Reparationsvorgänge und Verkalkungen im Bereich der Nekrosen: so fanden sich in der vorliegenden Untersuchung als Restzustände toxischer Gewebsschädigungen in den Nebennieren Verkalkungen unterschiedlichen Ausmaßes, wobei die Anzahl der betroffenen Tiere in Versuchs- und Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied zeigte (vgl. Abschnitt 3.4., S. 65). Da das mittlere Ausgangsgewicht der Tiere mit Nebennierenverkalkungen nicht vom mittleren Anfangsgewicht der übrigen Tiere abweicht, kann eine unterschiedliche Dosierung des DMBA bezogen auf das Körpergewicht der Tiere nicht angenommen werden.

Es ist nicht auszuschließen, daß der berichtete signifikante Unterschied der Anzahl der Tiere mit Nebennierenverkalkungen in Versuchs- und Kontrollgruppe artefiziell entstanden ist, da zwar alle Nebennieren untersucht wurden, aber keine Serienschnitte angefertigt wurden, so daß kleinere Verkalkungsherde sich möglicherweise der Beobachtung entzogen.

Das morphologische Erscheinungsbild der durch DMBA erzeugten Nebennieren-Schädigung ist mehrfach beschrieben (18, 41, 80).

Im akuten Stadium liegt eine hämorrhagische Nekrose der Nebennierenrinde vor, wobei vor allem die Zona reticularis und die Zona fasciculata betroffen sind; die Zona glomerulosa und das Nebennierenmark sind meist verschont oder nur in geringem Ausmaß betroffen.

Die Nebennieren der Überlebenden Tiere zeigen Reparationsvorgänge mit Organisationsgewebe, narbigem Ersatz und fleckiger Verkalkung des zugrundegegangenen Gewebes; z.T. besteht eine verstärkte Regeneration des erhaltenen Epithels; vereinzelt mit adenomähnlichen knotigen Hyperplasien.

Die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen histologischen Befunde an den Nebennieren von verendeten und getöteten Tieren entsprechen den oben zitierten Darstellungen; Nebennierenadenome wurden nicht beobachtet.

4.3. Klassifikations-Kriterien für Mamma-Tumoren der Ratte: Dignität, Histogenese und Topo-Histogenese

Die spontan entstandenen und experimentell induzierten Mamma-Geschwülste der Ratte werden in den Berichten der ersten Untersucher meist nur pauschal als Tumoren bezeichnet. Mit der ausgedehnten Verwendung der Ratte als biologisches Modell für die Erzeugung von Mamma-Tumoren trat bei der Klassifizierung der Tumoren die Unterscheidung zwischen Malignität und Benignität in den Vordergrund; meist wurden die entstandenen Tumoren in Adenocarcinome und Fibroadenome aufgegliedert.

Eine solche Klassifizierung nach der Dignität dürfte wohl auch heute für die Beurteilung carcinogener und cocarci-

nogener Stoffe im Tierexperiment ausreichend sein.

Dabei darf allerdings nicht übersehen werden, daß die Dignitätsbestimmung bei den Mamma-Tumoren der Ratte nicht unproblematisch ist, da die Tumoren meist sehr hochdifferenziert sind und nur in seltenen Fällen invasiv wachsen oder Metastasen setzen.

Unter Anwendung der in Abschnitt 3.2.1., S. 38 ff., erwähnten histologischen und zytologischen Malignitäts-Kriterien, derer sich auch andere Autoren bedienen ((82) S. 37 ff, (69) S. 421 ff, (83) S. 131 ff), dürfte die Dignitätsbestimmung der Tumoren jedoch mit ausreichender Sicherheit möglich sein.

Wenn die Klassifizierungsvorschläge verschiedener Autoren (siehe unten) ebenso wie die eigene hier verwendete Klassifizierung die Mamma-Tumoren noch detaillierter aufschlüsseln als nur nach Dignitäts-Kriterien, so geschieht dies aus verschiedenen Gründen.

Eine präzise Einteilung der Tumoren nach morphologischen Gesichtspunkten soll die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen miteinander vergleichbar machen und gleichzeitig Ähnlichkeiten und Unterschiede zu menschlichen Mamma-Tumoren zeigen; weiter soll dadurch eine evtl. Zuordnung der Morphologie zum biologischen Verhalten des Tumors und eine evtl. Zuordnung experimenteller Verfahrensweisen zu den entstehenden Tumorarten ermöglicht werden. Schließlich könnte eine differenzierte Klassifikation Basis sein für Überlegungen zur Topo-Histogenese und Pathogenese der Mamma-Tumoren.

Die große morphologische Variationsbreite zwischen den verschiedenen Mamma-Tumoren und innerhalb desselben Mamma-Tumors bei der Ratte ist wohl mit ein Grund, daß noch keine einheitliche Nomenklatur und keine klaren Kriterien für eine Klassifikation vorliegen: eine allgemein akzeptierte und damit weitgehend vergleichbare Klassifikation, wie

sie beim Menschen durch die Weltgesundheitsorganisation vorgelegt wurde, fehlt.

Über den Wert und die Aussagekraft von Tumor-Klassifikationen schreibt AZZOPARDI: "Keine Klassifikation ist perfekt, und es ist auch nicht wahrscheinlich, daß es jemals eine perfekte Klassifikation geben wird.

Eine Klassifikation sollte einfach und leicht zu verstehen sein, sie sollte durch verschiedene Untersucher reproduzierbar sein und so umfassend wie es mit der geforderten Klarheit vereinbar ist.

Alle Klassifikationen hängen ab von unserer Kenntnis der Pathologie und Histogenese der Tumoren, die eingeordnet werden sollen; da dieses Wissen bei weitem nicht vollständig ist, kann keine Klassifikation mehr sein als eine wohlüberlegte Arbeitshypothese." ((6), S. 240)

Die meisten neueren Klassifikationen von Mamma-Tumoren bei Ratten ordnen die spontanen und induzierten Tumoren nach Histogenese und Dignität.

So gliedert THOMAS (Tabelle 13, S. 79) ebenso wie YOUNG und HALLOWES (Tabelle 14, S. 80) in epitheliale, mesenchymale und gemischte Tumoren, wobei YOUNG und HALLOWES fragwürdigerweise die Dignität direkt mit der Histogenese koppeln, während THOMAS maligne und benigne Tumoren in allen drei histogenetischen Gruppen unterscheidet.

Im Zusammenhang mit der Tumorklassifikation weisen YOUNG und HALLOWES ((82), S. 33 Fußnote) ausdrücklich auf die Ähnlichkeit ihrer Nomenklatur mit den Bezeichnungen für menschliche Tumoren hin und stellen fest, daß die bei der Ratte auftretenden Tumoren wohl mit menschlichen Mamma-Tumoren vergleichbar seien, nicht aber umgekehrt alle beim Menschen auftretenden Tumorformen auch bei der Ratte ihre Entsprechung finden.

Wie die bereits genannten Autoren gliedern auch KOMI-TOWSKI et al. ((40), Tabelle 15, S. 81) die Mamma-Tumoren

Tabelle 13: Klassifikation der Mammatumoren
der Ratte
THOMAS (69), S. 421

Epitheliale Tumoren

Adenome mit oder ohne Sekretion

Carcinome

tubuläre Carcinome

alveoläre Carcinome

drüsig papilläre Carcinome

solide Carcinome

verwilderte, sarkomartig wachsende Carcinome

Mesenchymale Tumoren

Fibrome

Fibrosarkome

Mischtumoren

Fibroadenom, Adenofibrom

Carcinosarkom

Tabelle 14: Klassifikation der Mamma-Tumoren
der Ratte

YOUNG und HALLOWES (82) S. 33

Benigne fibroepitheliale Tumoren

Adenom

Fibroadenom

perikanalikulär

intrakanalikulär

Fibrom

Maligne epitheliale Tumoren

Adenocarcinom

Papilläres Carcinom

Anaplastisches Carcinom

Cribriformes Carcinom

Comedocarcinom

Plattenepithelcarcinom

Maligne mesenchymale Tumoren

Sarkom

Tabelle 15: Klassifikation der Mamma-Tumoren
der Ratte
KOMITOWSKI et al. (40)

I. FIBROEPITHELIALE TUMOREN

A. Fibroadenome

1. tubulär oder acinär
2. sklerosiert
3. proliferierend
4. mit Spaltbildungen

B. Zusammengesetzte Tumoren (compound tumors)

C. Carcinosarkome

D. Lobuläre Carcinome

II. EPITHELIALE TUMOREN

A. tubuläre (einfache) Adenome

B. Cystadenome

C. Anaplastische Adenocarcinome

1. kleinzellig
2. mit glomerulaähnlichen Strukturen
(glomerate type)

D. Plattenepithel-Tumoren

1. Plattenepithel-Carcinom
2. Adenoakanthom

III. REIN MESENCHYMALE TUMOREN

A. Fibrome

B. Fibrosarkome

nach histogenetischen Gesichtspunkten mit weiterer Unterteilung nach der Dignität; die Klassifikation enthält jedoch Besonderheiten, auf die im folgenden eingegangen wird.

In der Obergruppe der fibroepithelialen Tumoren findet sich bei KOMITOWSKI et al. mit dem Begriff des lobulären Carcinoms eine Bezeichnung, die den topohistogenetischen Ursprung des Tumors angeben soll; die Autoren beschreiben als lobuläres Carcinom bei der Ratte Carcinome mit lobulärem Wachstum aus tubulär angeordneten Tumorzellen mit reichlich bindegewebigem Stroma.

Die so definierte Bezeichnung lobuläres Carcinom für Tumoren der Ratte suggeriert eine Vergleichbarkeit zum lobulären Carcinom des Menschen, deren Wert zurückhaltend beurteilt werden muß, da morphologisch durchaus unterschiedlich gestaltete Carcinome der Ratte einen läppchenartigen Aufbau zeigen können ohne die charakteristischen histologischen und zytologischen Merkmale und ohne das typische Invasionsmuster der menschlichen lobulären Carcinome.

Andere Autoren wenden die Begriffe lobulär und duktal in ihren Klassifikationen von Rattentumoren prinzipiell nicht an (Tabelle 13, S. 79, Tabelle 14, S. 80, Tabelle 16, S. 85); ZWIETEN ((83), S. 121) bezweifelt ausdrücklich, daß es bei der Ratte ein Äquivalent zum lobulären Carcinom der Frau gibt.

RUSSO et al. (58) haben Untersuchungen über die Entstehung chemisch induzierter Mamma-Carcinome der Ratte vorgelegt, auf denen unsere Kenntnisse über die Topo-Histogenese dieser Tumoren im wesentlichen beruhen. Nach Carcinogengabe kommt es bei der jugendlichen Ratte zur gesteigerten Proliferation in den Proliferationsknospen (siehe Abschnitt 1.8.; S. 25 ff.), die den Endverzweigungen des duktales Systems bzw. der Übergangsstelle von Gangsystem und Läppchen entsprechen. Die gesteigerte Proliferation im Bereich

der Proliferationsknospen geht über in eine gesteigerte duktale Proliferation und schließlich ins Carcinom. Beim Menschen werden für die Topo-Histogenese der Mamma-Carcinome ähnliche Verhältnisse diskutiert, wobei nach WELLINGS et al. (76) letzte extralobuläre duktale bzw. bereits intralobuläre Ganganteile als Ausgangspunkt für das duktale wie das lobuläre Carcinom des Menschen in Frage stehen: lobulär und duktal bezeichnen also offenbar eher unterschiedliche histologische Tumorwachstumsformen als deutlich unterschiedliche Ursprungsorte der Carcinome im Drüsenbaum.

Da es also bei der Ratte offenbar kein echtes morphologisches Korrelat zu dem beim Menschen als lobulär bezeichneten Carcinom gibt und der Begriff lobulär in seiner topohistogenetischen Bedeutung nach den oben dargestellten Ergebnissen anzuzweifeln ist, sollte die Bezeichnung lobuläres Carcinom in Klassifikationen von Mamma-Tumoren der Ratte vermieden werden.

Als weitere Besonderheit findet sich in der Klassifikation von KOMITOWSKI et al. (Tabelle 15, S. 81) der Begriff des "zusammengesetzten Tumors" (compound tumor), bei dem die Frage nach der Dignität bewußt offen gelassen wird. KOMITOWSKI et al. bezeichnen mit diesem Begriff die häufigste experimentell erzeugte Tumorart mit lobulärem Baumuster und einem weiten Bereich unterschiedlicher Strukturen bei überwiegend tubulo-papillärer Bauweise.

Das biologische Verhalten wird als teils expansiv, teils infiltrierend, teils metastasierend beschrieben.

Bei aller notwendigen Skepsis gegenüber eindeutigen Dignitätsdiagnosen bei Mamma-Tumoren der Ratte scheint es dagegen doch notwendig und möglich, in einer Tumorklassifikation eine Entscheidung über die Dignität anhand der bereits erwähnten Kriterien zu verlangen, da sonst wesentliche biologische Unterschiede in den Untersuchungsergebnissen verwischt werden.

Auch die Tumor-Klassifikation von ZWIETEN (Tabelle 16, S. 85) unterscheidet grundsätzlich zwischen benignen und malignen Tumoren mit weiterer Unterteilung nach der Histogenese. Die Carcinome werden in invasive und nicht-invasive Formen untergliedert, um das biologische Verhalten der Tumoren schärfer zu charakterisieren.

Adenome und Carcinome werden nach den epithelialen Wachstumsformen deskriptiv weiter unterteilt; der Tatsache, daß oft verschiedene Wachstumsmuster in ein und demselben Tumor auftreten, wird durch deskriptive Doppelbezeichnungen Rechnung getragen.

Auch bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tumor-klassifikation (siehe Tabelle 5, S. 43) steht die Bewertung der Dignität im Vordergrund.

Der Inhomogenität der Ratten-Tumoren wird dadurch Rechnung getragen, daß die Carcinome untergliedert werden in Tumoren, die überwiegend aus einer Komponente bestehen, sowie in Tumoren, die aus zwei Komponenten in annähernd gleichem Verhältnis zusammengesetzt sind. Zur Charakterisierung der einzelnen epithelialen Baumuster werden deskriptive Bezeichnungen verwendet.

Die eigene Klassifikation entspricht also am ehesten der von ZWIETEN (Tabelle 16, S. 85) vorgeschlagenen.

Einige Tumorformen, die in den oben beschriebenen Tumor-klassifikationen aufgeführt werden, wie z.B. das Plattenepithelcarcinom, das anaplastische Carcinom oder das Carcinosarkom wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet. An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß in der eigenen Untersuchung 31 Mamma-Tumoren der Ratte zur Beobachtung kamen, während anderen Autoren Tumorzahlen ganz anderer Größenordnung als Grundlage für ihre Tumor-Klassifikationen zur Verfügung standen: so untersuchte ZWIETEN ((83; S. 66) 2978 Mamma-Tumoren, THOMAS ((69), S. 392) 668 Tumoren, YOUNG und HALLOWES ((82), S. 38) mehrere tausend Tumoren und KOMITOWSKI et al. (40) 170 spontane und 1613

Tabelle 16: Klassifikation der Mamma-Tumoren
 der Ratte
 ZWIETEN (83) S. 67

A. BENIGNE MAMMA-TUMOREN

1. Adenom
 - a. tubuläres Adenom
 - b. sezernierendes Adenom
2. Papilläre Tumoren
 - a. intraduktales Papillom
 - b. papilläres Cystadenom
3. Fibroadenom
 - a. Fibroadenom ohne weitere Spezifizierung
 - b. proliferierendes Fibroadenom
4. Fibrom

B. MALIGNE MAMMA-TUMOREN

1. Nichtinvasive Carcinome
 - a. tubulopapilläres Carcinom
 - b. kompaktes tubuläres Carcinom
 - c. cribriformes bzw. Comedocarcinom
2. Invasive Carcinome
 - a. tubulopapilläres Carcinom
 - b. kompaktes tubuläres Carcinom
 - c. cribriformes bzw. Comedocarcinom
 - d. anaplastisches Carcinom
3. Carcinom in Fibroadenom
4. Carcinosarkom
5. Sarkom

induzierte Mamma-Tumoren.

Die relativ geringe eigene Tumorausbeute von 31 Mamma-Tumoren insgesamt erlaubt auch keine Aussagen über Unterschiede der Tumormorphologie zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe.

Neben dem Mamma-Carcinom der Ratte und den damit verbundenen Problemen der Dignitätsbestimmung, der Klassifizierung und Topo-Histogenese der Carcinome verdienen auch noch andere Mamma-Tumoren der Ratte eine ausführlichere Erwähnung.

Unter den Adenomen werden benigne Mamma-Tumoren mit einer überwiegenden epithelialen Komponente und einem wechselnden bindegewebigen Tumoranteil verstanden, wobei im Rahmen der vorliegenden Untersuchung die Adenome nach der Ausformung ihrer epithelialen Komponente deskriptiv als sezernierend, papillär oder zystisch bezeichnet werden. Nach den Untersuchungen von RUSSO et al. (58) gehen die induzierten Mammaadenome offenbar aus proliferierenden Alveolar-Knospen hervor (vgl. Abschnitt 1.8., S. 25 ff.) und entstehen nicht über eine duktale Proliferation wie die Carcinome; die Adenome werden auch nicht als Präkanzerose angesehen.

Die Fibroadenome der Mamma nehmen eine gewisse Sonderstellung ein; unter Fibroadenomen werden benigne Mamma-Tumoren mit weit überwiegender Bindegewebskomponente verstanden, die - wie beim Menschen - in peri- und intrakanalikulärer Form auftreten.

Das Fibroadenom stellt den häufigsten Spontantumor der weiblichen Ratte dar, Fibroadenome gehören aber auch zu den chemisch induzierbaren Tumoren.

Da nach den Untersuchungen von RUSSO et al. (58) das Alter der Tiere bei der Carcinogenapplikation keine Rolle für die Ausbeute an Fibroadenomen zu spielen scheint - im Gegensatz zur Ausbeute an Adenomen und Carcinomen - ist es auch fraglich, ob den Fibroadenomen derselbe Entstehungsmechanismus wie den Adenomen und Carcinomen zugrunde liegt.

Auch beim Menschen ist die Pathogenese des Fibroadenoms nicht geklärt; Untersuchungen an frühen Entwicklungsstadien von Fibroadenomen zeigen möglicherweise hormonal bedingte Quellungszustände des Mantelbindegewebes, die in eine Proliferation von Bindegewebe und nur in eine geringe Proliferation des Epithels überleiten, so daß - nach BÄSSLER - "das Fibroadenom als Hyperplasie des Mantelgewebes aufzufassen ist" ((7) S. 365). Unterschiede in der Pathogenese zu den Adenomen, bei denen die epitheliale Proliferation ganz im Vordergrund steht, sind wahrscheinlich.

Wegen der oben aufgeführten Charakteristika der Fibroadenome werden diese Tumoren im Ergebnisteil zwar in die Tumorgesamtausbeute aufgenommen, innerhalb der benignen Mamma-Tumoren jedoch nicht den Adenomen subsumiert.

Das in der eigenen Untersuchung beobachtete Auftreten eines Carcinoms in einem Fibroadenom wird auch in der Literatur als Sonderfall beschrieben; einzelne Tumoren mit Übergang atypischer Epithelproliferationen innerhalb eines Fibroadenoms in ein Carcinom werden von ZWIETEN ((83), S. 128) und YOUNG und HALLOWES ((82), S. 40) erwähnt.

Schließt man die Fälle aus, in denen Mamma-Carcinome auf benachbarte Fibroadenome übergreifen, so ist das Auftreten von Mamma-Carcinomen in Fibroadenomen auch beim Menschen extrem selten. In diesen Fällen wird das Fibroadenom nicht als Präkanzerose angesehen ((7), S. 374); Beweise für eine kausale räumliche oder zeitliche Beziehung zwischen Fibroadenom und einem in diesem Tumor entstandenen Carcinom liegen jedenfalls nicht vor.

Unter den spontanen wie chemisch induzierten malignen mesenchymalen Mamma-Tumoren der Ratte ist das Fibrosarkom der häufigste ((69; S. 429).

Histologisch kennzeichnend ist ein spindel- bis polymorph-zelliger Aufbau ((69)), S. 432), das Auftreten mehrkerniger Riesenzellen ((82), S. 38) sowie das Abwechseln kollagen-

reicher Tumorabschnitte mit zellreichen, kollagenarmen Abschnitten ((83), S. 111).

Der im eigenen Material gefundene mesenchymale Mamma-Tumor entspricht dieser Beschreibung und ist damit am ehesten als Fibrosarkom einzuordnen (siehe S. 54 und Abbildung 20 und 21, S. 55).

Im Bereich der Milchdrüsen sollen bei Ratten ebenso Liposarkome, Neurofibrosarkome, maligne fibröse Histiozytome, Hämangioperizytome und Hämangiome entstehen ((83), S. 114); solche Tumoren kamen im eigenen Untersuchungsgut nicht zur Beobachtung.

4.4. Häufigkeit und zeitliches Auftreten spontaner Mamma-Tumoren bei der Wistar-Ratte

Eine Zusammenstellung der Berichte über spontan aufgetretene Mamma-Tumoren bei weiblichen Wistar-Ratten führt zu dem in Tabelle 17, S. 89 wiedergegebenen Bild (Literaturübersicht modifiziert nach (65)).

Als bei weitem häufigster Spontantumor wird das Fibroadenom genannt.

Die ersten Fibroadenome treten nach einem Beobachtungszeitraum von ca. 10-14 Monaten in Erscheinung (27, 28, 39).

Die von den einzelnen Untersuchern angegebenen mittleren Latenzzeiten für Fibroadenome insgesamt liegen dabei wesentlich höher mit durchschnittlich ca. 20-25 Monaten.

Als zweithäufigster Spontantumor nach den Fibroadenomen werden die allerdings wesentlich seltener auftretenden Carcinome beschrieben, wobei die Angaben zur Häufigkeit stark schwanken und sich aus den unterschiedlichen Angaben Carcinom/Adenom-Verhältnisse errechnen lassen, die um den Faktor drei von einander differieren.

Tabelle 17:

Spontane Mamma-Tumoren bei weiblichen Wistar-Ratten
(modifizierte Literaturübersicht nach SHER (65))
FA = Fibroadenom; CA = Carcinom

Autor	Mamma-Tumoren (% tumortragender Tiere)	CA/Adenom- verhältnis	Versuchsdauer bzw. Latenzzeit (falls angegeben)
CRAIN (17)	ca. 14 % FA ca. 0,2 % CA (bei 452 Ratten 64 FA und 1 CA bei überwiegend einem Tumor pro Tier)	0,016	18-24 Monate
DELLA PORTA (21) et al.	21 % FA 10,4 % CA	0,5	ca. 30 Monate
GILBERT et al. (28)	16-33 % FA kein CA (drei verschiedene WISTAR- abgeleitete Stämme)		bis 36 Monate Auftreten der ersten Tumoren nach 12 - 14 Monaten
GILBERT und GILMANN (27)	14,5 % FA kein CA		bis ca. 40 Monate Aufreten der ersten FA nach 12 - 14 Monaten
MANNELL et al. (45)	8,3 % FA		ca. 25 Monate
KIM et al. (39)	20,5 % FA		10-33 Monate mittlere Latenzzeit 20 Monate
RATCLIFFE (50)	61 % "Tumoren" davon 4 % CA	0,07	mittlere Latenzzeit ca. 23 Monate 80 % der Mamma-Tumoren nach dem 15. Monat
TINSLEY et al. (71)	4 % FA		24 Monate

Weil in der eigenen Untersuchung eine Versuchsdauer von unter 12 Monaten geplant war, wurde aufgrund der aus der Literatur bekannten spontanen Tumorinzidenzen auf die Führung einer Kontrollgruppe ohne Carcinogengabe verzichtet, da wie oben dargelegt das Auftreten von Spontantumoren im ersten Lebensjahr bei der weiblichen Wistar-Ratte sehr unwahrscheinlich ist und die mittlere Latenzzeit für die spontanen Mamma-Tumoren etwa 20-24 Monate beträgt.

Die eigenen Ergebnisse mit einer Tumorausbeute von 27,3 % tumortragender Tiere in der Versuchsgruppe und 36,7 % in der Kontrollgruppe bei einem Carcinom/Adenomverhältnis von 2,25 bzw. 2,0 mit einer mittleren Induktionszeit für die Mamma-Carcinome von ca. 8 Monaten in der Versuchsgruppe und ca. 6,5 Monaten in der Kontrollgruppe zeigen hinreichend die Wirksamkeit des verwendeten Carcinogens in beiden Gruppen an; der Erwartungswert an spontanen Tumoren ist damit weit überschritten.

4.5. DMBA-induzierte Mamma-Tumoren bei der Wistar-Ratte

Durch eine einmalige orale Gabe von DMBA in einer Dosierung von 5-20 mg lassen sich bei weiblichen Wistar-Ratten in einem Prozentsatz von 20-100 % aller Versuchstiere Mamma-Tumoren erzeugen.

Die in der Tabelle 18, S. 91 wiedergegebene modifizierte Literaturübersicht nach THOMAS (69) zeigt die von verschiedenen Untersuchern bei der DMBA-induzierten Mamma-Carcinogenese gefundene Tumorausbeute mit dem prozentualen Anteil der tumortragenden Tiere sowie die Aufschlüsselung der Tumoren in Carcinome, Adenome und Fibroadenome mit den jeweiligen Induktionszeiten (soweit angegeben).

Aus der tabellarischen Übersicht geht hervor, daß bereits

Tabelle 18: DMBA-induzierte Mamma-Tumoren bei weiblichen Wistar-Ratten
(modifizierte Literaturübersicht nach THOMAS (69))

Autor	Dosis	Ausbeute (% tumortragender Tiere)	Histologie	Induktionszeit (Tage)
GRUENSTEIN et al. (29)	5 bzw. 10 mg (Tiergewicht 60-80g)	100 %	Carcinome Adenome Fibroadenome	189 315 322
KOVACS (41)	10 mg	100 %	Carcinome	
GRUENSTEIN et al. (29)	15 mg (Tiergewicht 60-80g)	40 %	7 Carcinome 2 Adenome 1 Fibroadenom	140 224 224
GRUENSTEIN et al. (29)	15 bzw. 20 mg (Tiergewicht 60-80g)	75,8 %	10 Carcinome 4 Adenome 11 Fibroadenome	182 357 315
POLLARD (49)	20 mg	20 %	Carcinome	111
GRUENSTEIN et al. (29)	20 mg (Tiergewicht 130-150g)	64 %	Carcinome	

bei geringer Dosierung (5 bzw. 10 mg DMBA) bis zu 100 % der Tiere Tumoren entwickeln (29, 41) während - wohl in Abhängigkeit vom Tiergewicht und damit der unterschiedlichen DMBA-Dosis bezogen auf das Körpergewicht - bei einer einmaligen Dosis von 20 mg DMBA Ausbeuten zwischen 20 % (49) und 75,8 % (29) berichtet werden.

Bei der Auswahl des in der eigenen Untersuchung verwendeten Tiermodells waren vor allem die Untersuchungen von GRUENSTEIN et al. (29) berücksichtigt worden, die bei Versuchstieren von einem Gewicht zwischen 130-150 g bei einmaliger oraler Gabe von 20 mg DMBA in ca. 22 Wochen bei 64 % der Tiere Carcinome beobachtet hatten.

Im Vergleich dazu fällt in der eigenen Untersuchung die Tumorausbeute (Tabelle 4, S. 40) mit 27,3 % carcinomtragender Tiere in der Versuchsgruppe und 20 % carcinomtragender Tiere in der Kontrollgruppe gering aus; auch wenn sämtliche entstandene Tumoren einschließlich Adenome, Fibroadenome und Sarkome berücksichtigt werden, bleibt die Ausbeute mit 27,3 % tumortragender Tiere in der Versuchsgruppe und 36,7 % in der Kontrollgruppe deutlich hinter der erwarteten Tumorausbeute zurück.

Wenn man bei der Bewertung dieser Unterschiede in der Tumorausbeute zu den in der Literatur angegebenen Werten von einer korrekten Applikation des wirksamen Carcinogens und einer vollständigen Erfassung aller entstandenen Tumoren ausgeht, dann muß die Erklärung für die unterschiedliche Tumorausbeute in einer möglicherweise genetisch fixierten unterschiedlichen Reaktion der Versuchstiere gesucht werden, auch wenn es sich um vom gleichen Tierstamm abgeleitete Inzuchtstämme handelt.

Unterschiede in den Stoffwechselabläufen bei Aktivierung und Elimination des Carcinogens oder unterschiedlich funktionsfähige DNS-Reparaturmechanismen könnten hier eine Rolle spielen.

4.6. Einfluß der Chenodesoxycholsäure auf Ausbeute, Induktionszeit, Metastasierung und Lokalisation von DMBA-induzierten Mamma-Carcinomen

Als Parameter zur Bewertung einer möglichen tumorpromovierenden Wirkung der Chenodesoxycholsäure bei DMBA-induzierter Mamma-Carcinogenese der Ratte wurde in Versuchs- und Kontrollgruppe die Tumorausbeute (Tabelle 4, S. 40) und Tumorinduktionszeit (Tabelle 6, S. 58) bestimmt.

Die Anzahl der mammatumortragenden Tiere in beiden Gruppen zeigte ebensowenig einen signifikanten Unterschied wie die Anzahl der Tiere mit Carcinomen und Adenomen allein. Dennoch läßt sich aus dem Versuchsergebnis eine, wenn auch statistisch nicht sicherbare, Tendenz ableiten: die absolute Anzahl der Mamma-Tumoren insgesamt, die Anzahl der Carcinome und die mittlere Tumorzahl/Tier war bei den Ratten der Versuchsgruppe, deren Futter Chenodesoxycholsäure enthielt, höher als in der Kontrollgruppe.

Auch das Carcinom/Adenom-Verhältnis lag bei der Versuchsgruppe mit 2,25 höher als bei den Kontrolltieren mit 2,0. In beiden Gruppen traten die Carcinome eher auf als Adenome bzw. Fibroadenome (Tabelle 6, S. 58).

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Literatur über DMBA-induzierte Mamma-Tumoren bei der Wistar-Ratte, wie aus der Tabelle 18, S. 91, hervorgeht: während die Induktionszeit für Mamma-Carcinome ca. 111 bis 189 Tage beträgt, liegen die Induktionszeiten für Fibroadenome und Adenome zwischen ca. 224-357 Tagen.

Die mittleren Induktionszeiten für Carcinome in der Versuchsgruppe (238 Tage) und der Kontrollgruppe (194 Tage) liegen also ebenso im erwarteten zeitlichen Rahmen wie die Induktionszeit für Adenome bei den Kontrolltieren (261 Tage); Adenome in der Versuchsgruppe kamen erst nach der Obduktion am Versuchsende zur Beobachtung, wobei das

Alter der Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt ca. 1 Jahr betrug (mittlere Versuchsdauer 309 Tage; Lebensalter bei Versuchsbeginn ca. 50 Tage, siehe Abschnitt 2.1. und 2.3.). Die auffällige Diskrepanz der mittleren Induktionszeit für Carcinome zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe mit einem früheren Auftreten der Carcinome in der Kontrollgruppe ist unerwartet und spricht gegen eine tumorpromovierende Wirkung der Gallensäure; es müßte im Gegenteil eine protektive Wirkung der Chenodesoxycholsäure in der Versuchsgruppe angenommen werden, wobei nur die Induktionszeit, aber nicht die Ausbeute (jedenfalls im beobachteten Zeitraum) betroffen wäre.

In diesem Zusammenhang ist allerdings nicht völlig auszuschliessen, daß bei einer Abweichung des mittleren Ausgangsgewichtes der Tiere beider Gruppen von ca. 11 g die durchschnittlich leichteren Tiere der Kontrollgruppe eine gering höhere Dosis DMBA bezogen auf das Körpergewicht erhielten, so daß die kürzere Induktionszeit für Mamma-Carcinome in der Kontrollgruppe möglicherweise einen dosisbedingten Effekt des Carcinogens darstellt.

Tumorgößen und durchschnittliche Tumorwachstumsgeschwindigkeit (Tabelle 7, S. 59) für die Mamma-Carcinome lagen in beiden Gruppen in der gleichen Größenordnung, so daß Einflüsse der verfütterten Gallensäure auf diese Parameter nicht ableitbar sind; die beobachtete langsamere Wachstumsgeschwindigkeit der Adenome gegenüber den Carcinomen steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen in der Literatur ((69) S. 437).

Da die Mamma-Tumoren der Ratte eine Neigung zur Wachstumsstagnation - nach YOUNG und HALLOWES (82) bei bis zu 50 % der Tumoren - und zu Spontanremission haben - bis zu ca. 30 % der Tumoren (82) - muß die Vergleichbarkeit von Tumorgößen und Wachstumsgeschwindigkeiten ohnehin vorsichtig beurteilt werden.

Da nur bei einem einzigen Tier (in der Versuchsgruppe) eine - lymphogene - Metastase eines Mamma-Carcinoms beob-

achtet wurde, kann ein Einfluß der Chenodesoxycholsäure auf das Metastasierungsverhalten von Mamma-Tumoren nicht abgeleitet werden.

Angaben zur Häufigkeit der Metastasierung von Mamma-Carcinomen der Ratte variieren in der Literatur stark; die meisten Autoren berichten das Fehlen von Metastasen oder eine Frequenz zwischen 2 bis 3 % (Übersicht bei (83), S.132). Während z.B. THOMAS ((69), S. 438) von hämatogenen Lungenmetastasen in 12 bis 20 % bei Ratten mit Mamma-Carcinomen berichtet und KOMITOWSKI et al. (40) bei bis zu 36 % der Mamma-Carcinome Lungenmetastasen beobachten, finden YOUNG und HALLOWES ((82), S. 38) unter mehreren tausend Tumoren keine Metastasen.

Das unterschiedliche Metastasierungsverhalten wird offenbar bedingt durch den Tierstamm, die Versuchsanordnung, den Immunstatus und das Alter der Tiere, da Tumoren der Ratten offenbar später metastasieren als Tumoren der Menschen; Ratten, die Tumoren tragen, müssen deshalb für eine genaue Aussage zum Metastasierungsverhalten über ihre ganze Lebensspanne beobachtet werden.

Die Genauigkeit der makroskopischen und histologischen Aufarbeitung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die Zahl der entdeckten Metastasen.

Die Lokalisation der in Versuchs- und Kontrollgruppe gefundenen Tumoren ist in Tabelle 8, S. 61 wiedergegeben, aufgliedert nach Quadranten sowie nach der Lokalisation in der oberen und unteren, rechten und linken Körperhälfte. Weder für Carcinome noch Adenome noch für die Mamma-Tumoren insgesamt ergab sich zwischen beiden Gruppen ein statistisch gesicherter Unterschied; ein Einfluß der Chenodesoxycholsäure auf die Lokalisation der entstandenen Mamma-Tumoren kann also nicht angenommen werden.

Das in der Literatur berichtete bevorzugte Auftreten DMBA-induzierter Mamma-Tumoren in der thorakalen Körperregion

((82), S. 44; (72)) konnte in der vorliegenden Untersuchung, möglicherweise wegen zu geringer Tumorzahlen, nicht bestätigt werden.

4.7. Extramammäre Neoplasien

Ein Einfluß der verfütterten Gallensäure Chenodesoxycholsäure auf die Entstehung von extramammären Neubildungen bei DMBA-induzierter Carcinogenese der Ratte läßt sich aus den in der gewählten Versuchsanordnung erzielten Ergebnissen nicht nachweisen (Tabelle 9, S. 63).

So entstanden in der Versuchsgruppe fünf und in der Kontrollgruppe drei Plattenepithelcarcinome des äußeren Gehörgangs sowie in jeder Gruppe je ein, ebenfalls im äußeren Gehörgang lokalisierter, epithelialer Tumor mit fraglicher Dignität; ein statistisch sicherbarer Unterschied zwischen beiden Gruppen ist daraus nicht abzuleiten.

Das Auftreten von Carcinomen des äußeren Gehörgangs nach Gabe von DMBA ist beschrieben (38, 41). Als Ausgangsort dieser Tumoren werden die Talgdrüsen des äußeren Gehörgangs angesehen (48), wobei Plattenepithelcarcinome häufiger auftreten als Carcinome mit erhaltener talgdrüsenartiger Differenzierung.

In der Versuchs- und Kontrollgruppe traten weiter je eine Neoplasie des lymphatischen sowie des hämatopoetischen Systems auf (Tabelle 9, S. 63).

Die Entstehung von Lymphomen und Myelosen nach Applikation von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen bei der Ratte ist bekannt (68); bei der Wistar-Ratte wird nach DMBA-Gabe vom Auftreten granulozytärer Leukämien (29) sowie von Stammzell-Leukämien (41) und Lymphomen (29) berichtet.

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei einem Tier der Kontrollgruppe ein Colon-Carcinom gefunden; die Entstehung einzelner Colon-Carcinome bei Ratten nach DMBA-Gabe

ist ebenfalls in der Literatur belegt (41).

Neoplasien anderer Organe, insbesondere der Nieren und der Lunge waren in Versuchs- und Kontrollgruppe nicht nachweisbar.

4.8. Aussagekraft der Untersuchung und neue Ansätze

In den Abschnitten 1.1. bis 1.6. der Einleitung wurde erläutert, welche Überlegungen zu der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Fragestellung führten: ob nämlich Gallensäuren, speziell die Chenodesoxycholsäure, im Tierexperiment als Promotor bei der Entstehung chemisch induzierter Mamma-Carcinome wirken.

Da zu dieser Fragestellung in der Literatur offenbar noch keine Untersuchungen vorliegen, muß vor allem die angewandte Methodik und damit die Aussagekraft der oben dargelegten Ergebnisse zur Diskussion gestellt werden.

Eine für die Fragestellung wesentliche Grundvoraussetzung scheint im Rahmen des gewählten Versuchsmodells jedenfalls gewährleistet: die Chenodesoxycholsäure-Verfütterung führt erwartungsgemäß zu einem Anstieg des Serum-Spiegels der Chenodesoxycholsäure im peripheren Blut. Damit ist mindestens die theoretische Möglichkeit einer hämatogenen tumorpromovierenden Wirkung bei vermehrter Resorption von Chenodesoxycholsäure aus dem Darm gegeben.

Das gewählte biologische Modell enttäuschte insofern nicht, als bei den verwendeten Ratten nach Gabe des Carcinogens DMBA innerhalb einer Versuchsdauer von ca. 10 Monaten eine Mamma-Tumorausbeute erzielt werden konnte, die weit über der für diesen Zeitraum zu erwartenden Anzahl von Spontan-tumoren lag. Dennoch konnten die z.T. in der Literatur beschriebenen Tumorausbeuten (siehe Tabelle 18, S. 91) bei weitem nicht erreicht werden; die bei der Wahl des

Versuchsmodells angestrebte Tumorausbeute von ca. 60 % tumortragender Tiere wurde deutlich unterschritten.

Die Unterschiede der Tumorausbeute in Versuchs- und Kontrollgruppe waren nicht groß genug, um sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % oder auch nur 5 % als nicht-zufällig statistisch sichern zu lassen.

So kann das vermehrte Auftreten von Tumoren insgesamt und von Carcinomen in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nur als bemerkenswerte Tendenz zur Kenntnis genommen werden.

Auch das Carcinom/Adenom-Verhältnis in beiden Gruppen wie die Tumorinduktionszeit geben keinen Beweis für eine tumorpromovierende Wirkung der untersuchten Gallensäure; ebenso wenig sind Einflüsse auf Metastasierung und Lokalisation der Mamma-Tumoren oder auf die Entstehung extramammärer Neoplasien nachweisbar.

Unterschiede im feingeweblichen Aufbau der entstandenen Mamma-Tumoren waren nicht erwartet worden und wären bei der geringen Anzahl der Tumoren auch nicht zu sichern.

Als Fazit der vorausgegangenen Darlegungen kann also gelten:

Eine tumorpromovierende Wirkung oral aufgenommener Chenodesoxycholsäure auf die DMBA-induzierte Mamma-Carcinogenese der Wistar-Ratte konnte nicht nachgewiesen werden.

Die vorsichtig als Tendenz gewertete höhere Tumorausbeute der Versuchsgruppe läßt aber die Frage offen, ob möglicherweise bei der unerwartet niedrigen Gesamttumorausbeute in beiden Gruppen die Trennschärfe der Teststatistik nicht ausreichte, um einen tatsächlich vorhandenen nicht-zufälligen Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachzuweisen.

Außerdem muß berücksichtigt werden, daß aus der Gesamtgruppe der Gallensäuren mit der primären Gallensäure Chenodesoxycholsäure auch nur ein einziger Vertreter untersucht wurde.

Bevor also die Hypothese einer möglichen tumorpromovierenden Wirkung von Gallensäuren auf die Entwicklung des Mamma-Carcinoms endgültig fallengelassen wird, sollten in einem Versuchsmodell mit höherer Mamma-Tumor-Ausbeute neben einer primären Gallensäure auch sekundäre Gallensäuren, wie z.B. die Lithocholsäure, auf eine tumorpromovierende Wirkung bei der Mamma-Carcinogenese untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die durch epidemiologische Untersuchungen belegten exogenen ernährungsbedingten Risikofaktoren von Mamma- und Colon-Carcinom entsprechen sich weitgehend.

Ausgehend von der Bedeutung der in ihrem Stoffwechsel eng mit der Ernährungsweise verbundenen Gallensäuren bei der Colon-Carcinogenese, liegt die Frage nahe, ob Gallensäuren möglicherweise auch eine tumorpromovierende Wirkung bei der Entstehung von Mamma-Carcinomen haben.

Als experimentelles Modell zur Beantwortung dieser Frage dient in der vorliegenden Arbeit die 7,12-Dimethylbenz(a)-anthrazen-induzierte Mamma-Carcinogenese der Wistar-Ratte; geprüft wird der Effekt einer nach Carcinogengabe einsetzenden Verfütterung der primären Gallensäure Chenodesoxycholsäure bei den Versuchstieren gegenüber Kontrolltieren mit gallensäurefreiem Standardfutter. In einer weiteren Versuchsanordnung wird gezeigt, daß die Aufnahme der Chenodesoxycholsäure mit dem Futter sowohl zu einem absoluten als auch relativen Anstieg der Chenodesoxycholsäurekonzentration im Blutserum des großen Kreislaufs der Versuchstiere führt, womit eine wesentliche Voraussetzung für eine eventuelle tumorpromovierende Wirkung von Gallensäuren bei der Mamma-Carcinogenese erfüllt ist.

Dignität, Histogenese und morphologische Struktur bilden die Grundlage für die Einordnung der nach Carcinogengabe entstandenen Mamma-Tumoren; Probleme der Dignitätsbewertung und der Klassifizierung von Mamma-Tumoren der Ratte finden dabei Berücksichtigung.

Aus dem Versuchsergebnis läßt sich ein Einfluß der Chenodesoxycholsäure auf die 7,12-DMBA-induzierte Mamma-Carcinogenese der Wistar-Ratte nicht ableiten.

Tumorausbeute, Tumorinduktionszeit, Carcinom-Adenom-Verhältnis und Metastasierungsverhalten der induzierten Ma-

ma-Tumoren in der Versuchsgruppe, die chenodesoxycholsäurehaltiges Futter erhielt, gaben keinen gegenüber der Kontrollgruppe statistisch sicherbaren Hinweis auf eine tumorpromovierende Wirkung der verwendeten Gallensäure.

Auch bei den extramammären Neoplasien bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

Die Anzahl der tumortragenden Tiere, die Zahl der Mamma-Tumoren insgesamt und die Zahl der Mamma-Carcinome war allerdings in der Versuchsgruppe, deren Futter Chenodesoxycholsäure enthielt, höher als in der Kontrollgruppe, wobei jedoch ein zufälliges Zustandekommen des Unterschiedes zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe durch die Teststatistik nicht ausgeschlossen werden konnte.

Da in beiden Gruppen deutlich weniger Tumoren als erwartet entstanden, bleibt offen, ob eine bestehende unterschiedliche Tendenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe letztlich nur wegen einer zu geringen Tumorausbeute statistisch nicht zu sichern war.

Bei kritischer Würdigung der Aussagekraft der vorliegenden Untersuchung sollte die Ausgangshypothese noch nicht völlig verworfen werden; vielmehr erscheint ihre erneute Überprüfung an einem experimentellen Modell mit höherer Mamma-Tumor-Ausbeute und unter Einbeziehung weiterer, auch sekundärer Gallensäuren, angebracht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adelstein P., Baldwin J.A., Fedrich J.:
Cancers of the large bowel: associated disorders in
individuals.
Cancer 43, 2553-2557, 1979
2. Ahlberg J., Angelin B., Björkheim I., Einarsson K.:
Individual bile acids in portal venous and systemic
blood serum of fasting man.
Gastroenterology 73, 1377-1382, 1977
3. Alderson M.R.:
Breast cancer and the leads from geographical pathology.
In: Grundmann E. (Hrsg.):
Cancer Campaign, Vol. 6: Cancer Epidemiology
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1982
4. Anderson D.E.:
Some characteristics of familial breast cancer.
Cancer 28, 1500-1504, 1971
5. Aries V.C., Crowther J.S., Drasar B.S., Hill M.J.,
Williams R.E.O.:
Bacteria and the etiology of cancer of the large bowel.
Gut 10, 334-335, 1969
6. Azzopardi J.G.:
Problems in breast pathology.
Saunders Company London, 1979
7. Bässler R.:
Pathologie der Brustdrüse.
In: Doerr W., Seifert G., Uehlinger E. (Hrsg.):
Spezielle Pathologische Anatomie Band 11.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1978

8. Becker N., Frentzel-Beyme R., Wagner G.:
Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland.
Springer Verlag Berlin, New York, Tokio 1984 ²
9. Botham K.M., Boyd G.S.:
Metabolism of chenodeoxycholic acid to β -muricholic
acid in rat liver.
Eur. J. Biochem. 134, 191-196, 1983
10. Botham K.M., Boyd G.S.:
The effect of dietary fat on bile salt synthesis in
rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 752, 307-314, 1983
11. Boyland E., Sydnor K.L.:
The induction of mammary cancer in rats.
Brit. J. Cancer 16, 731-739, 1962
12. Bremond A., Collet P., Lambert R., Martin J.:
Breast cancer and polyps of the colon.
Cancer 54, 2568-2570, 1984
13. Burkitt D.P.:
Epidemiology of cancer of the colon and rectum.
Cancer 28, 3-13, 1971
14. Byers T., Graham S.:
The epidemiology of diet and cancer.
In: Klein G., Weinhouse S. (Hrsg.):
Advances in Cancer Research Vol. 41,
Academic Press Orlando, San Diego, 1984

15. Carey M.C.:
The enterohepatic circulation.
In: Arias I.M., Popper H., Schachter D., Shafritz D.A.
(Hrsg):
The Liver; Biology and Pathobiology
Raven Press New York, 1982
16. Cook J.W., Kennaway E.L., Kennaway N.M.:
Production of tumors in mice by deoxycholic acid.
Nature (Lond) 145, 627, 1940
17. Crain R.C.:
Spontaneous tumors in the Rochester strain of the
Wistar rat.
Am. J. Pathol. 34, 311-336, 1958
18. Dao T.L.:
The role of ovarian hormones in initiating the induction of mammary cancer in rats by polynuclear hydrocarbons.
Cancer Res. 22, 973-981, 1962
19. Dao T.L., Chan P.C.:
Hormones and dietary fat as promoters in mammary carcinogenesis.
Environ. Health Perspect. 50, 219-225, 1983
20. DeBarros S.G., Ballistreri W.F., Soloway R.D., Weiss S.G., Miller P.C., Soper K.:
Response of total and individual serum bile acids to endogenous and exogenous bile acid input to the enterohepatic circulation.
Gastroenterology 82, 647-652, 1982

21. Della Porta G., Colnaghi M.I., Parmiani G.:
Non-carcinogenicity of hexamethylenetetramine in mice
and rats.
Food Cosmet. Toxicol. 6, 707-715, 1968
22. Dobberstein J., Tamaschke Ch.:
Tumoren
In: Cohrs P., Jaffe R., Meessen H. (Hrsg.):
Pathologie der Laboratoriumstiere II. Band
Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1958
23. Doll R.:
The geographical distribution of cancer.
Brit. J. Cancer 23, 1-8, 1969
24. Duane W.C., Gilberstadt M.L., Wiegand D.M.:
Diurnal rythms of bile acid production in the rat.
Am. J. Physiol. 236, 175-179, 1979
25. Eyssen H., Smets L., Parmentier G., Janssen G.:
Sex linked differences in bile acid metabolism of
germ free rats.
Life Sci. 21, 707-712, 1977
26. Ferguson L.R., Parry J.M.:
Mitotic aneuploidy as a possible mechanism for tumor
promoting activity in bile acids.
Carcinogenesis 5, 447-451, 1984
27. Gilbert C., Gillman J.:
Spontaneous neoplasms in the albino rat.
S. Afr. J. Med. Sci. 23, 257-272, 1958
28. Gilbert C., Gillman J., Loustalot P., Lutz W.:
The modifying influence of diet and the physical
environment on spontaneous tumor frequency in rats.
Brit. J. Cancer 12, 565-593, 1958

29. Gruenstein M., Meranze D.R., Thatcher D., Shimkin M.B.:
Carcinogenic effects of intragastric 3-methyl-cholan-
threne and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in Wistar
and Sprague-Dawley rats.
J. Natl. Cancer Inst. 36, 483-502, 1966
30. Grundmann E.:
What's new in colon carcinogenesis?
Path. Res. Pract. 179, 429-432, 1985
31. Haenszel W., Kurihara M.:
Studies of Japanese migrants - I. Mortality from cancer
and other diseases among Japanese in the United States.
J. Natl. Cancer Inst. 40, 43-68, 1968
32. Hagemann E.:
Kleines Handbuch der Labortierzucht.
Verlagshaus Reutlingen Oertel und Spörer, Reutlingen,
1957
33. Hamilton T., Sneddon A.:
Endocrine differences between rats bearing simple and
malignant mammary tumors induced by 9,10-dimethyl-1,2-
benzanthracene.
Brit. J. Cancer 22, 324-345, 1968
34. Hill M.:
Epidemiology and etiology of colon cancer.
In: Grundmann E. (Hrsg.):
Cancer Campaign Vol. 2 Colon Cancer
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1978
35. Hill M., Goddard P., Williams R.E.O.:
Gut bacteria and etiology of cancer of the breast.
Lancet ii, 472-473, 1971

36. Hill P., Chan P., Cohen L., Wynder E., Kuno K.:
Diet and endocrine-related cancer.
Cancer 39, 1820-1826, 1977
37. Howell M.A.:
The association between colorectal cancer and breast cancer.
J. Chronic. Dis. 29, 243-261, 1976
38. Huggins C., Grand L.C., Brillantes F.P.:
Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression.
Nature (Lond) 189, 204-207, 1961
39. Kim U., Clifton K.H., Furth J.:
A highly inbred line of Wistar rats yielding spontaneous mammo-somatotropic pituitary and other tumors.
J. Natl. Cancer Inst. 24, 1031-1055, 1960
40. Komitowski D., Sass B., Laub W.:
Rat mammary tumor classification: Notes on comparative aspects.
J. Natl. Cancer Inst. 68, 147-156, 1982
41. Kovacs K.:
Effect of androgenisation on the development of mammary tumors in rats induced by the oral administration of 9,10-dimethyl-1,2-benanthracene.
Brit. J. Cancer 19, 531-537, 1965
42. Kuipers F., Havinga R., Bosschieter H., Toorop G.P., Hindriks F.R., Vonk R.J.:
Enterohepatic circulation in the rat.
Gastroenterology 88, 403-411, 1985

43. Leuschner U., Schneider M., Korte L.:
Der Einfluß von Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxy-
cholsäure auf die Leberstruktur der Ratte.
Z. Gastroenterol. 17, 244-256, 1979

44. Lynch H.T., Krush A.J.:
Heredity and adenocarcinoma of the colon.
Gastroenterology 53, 517-527, 1967

45. Mannell W.A., Grice H.C., Dupuis I.:
The effect on rats of long-term exposure to guinea-green
B and benzyl-violet 4 B.
Food Cosmet. Toxicol. 2, 345-347, 1964

46. Mannes G.A., Weinzierl M., Stellaard F., Wiebecke B.,
Thieme C., Paumgartner G.:
Häufigkeit von Dickdarmadenomen nach Cholezystektomie.
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Me-
dizin. 89. Band.
J.F.Bergmann Verlag, München, 1983

47. Narisawa T., Magadia N.E., Weisburger J.H., Wynder E.L.:
Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis
after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-
nitrosoguanidin in rats.
J. Natl. Cancer Inst. 53, 1093-1097, 1974

48. Pliss G.B.:
Tumors of the auditory sebaceous glands.
In: Turusov V.S. (Hrsg.):
Pathology of tumors in laboratory animals.
Vol. 1 Part 1
International agency for research on cancer, Lyon, 1973

49. Pollard M.:
Chemical induction of mammary cancer in germ-free rats.
Nature (Lond) 200, 1289-1291, 1963
50. Ratcliff H.L.:
Spontaneous tumors in two colonies of rats of the Wistar
Institute of anatomy and biology.
Am. J. Pathol. 16, 237-254, 1940
51. Reddy B.S., Mastromarino A., Wynder E.:
Diet and metabolism: Large bowel cancer.
Cancer 39, 1815-1819, 1977
52. Reddy B.S., Watanabe K., Weisburger J.H., Wynder E.L.:
Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis
in germ-free and conventional F 344 rats.
Cancer Res. 37, 3238-3242, 1977
53. Reddy B.S., Weisburger J.H., Wynder E.L.:
Effect of dietary fat level and dimethylhydrazine on
fecal acid and neutral sterol excretion and colon carci-
nogenesis in the rat.
J. Natl. Cancer Inst. 52, 507-511, 1974
54. Reddy B.S., Wynder E.L.:
Large bowel carcinogenesis: Fecal constituents of popu-
lations with diverse incidence rates of colon cancer.
J. Natl. Cancer Inst. 50, 1437-1442, 1973
55. Rozen P., Firemann Z., Figer A., Ron E.:
Colorectal tumor-screening in women with a past history
of breast, uterine or ovarian malignancies.
Cancer 57, 1235-1239, 1986

56. Russo I.H., Russo J.:
Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.
J. Natl. Cancer Inst. 61, 1439-1449, 1978

57. Russo J., Russo I.H.:
DNA labeling index and structure of the rat mammary gland as determinants of its susceptibility to carcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. 61, 1451-1459, 1978

58. Russo J., Saby J., Isenberg W.M., Russo I.H.:
Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.
J. Natl. Cancer Inst. 59, 435-445, 1977

59. Russo J., Wilgus G., Russo I.H.:
Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. I. Differentiation of the mammary gland as determinant of tumor incidence and type of lesion.
Am. J. Pathol. 96, 721-736, 1979

60. Sachs L.:
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag, Berlin, 1972³

61. Sachs L.:
Angewandte Statistik.
Springer Verlag, Berlin 1973

62. Sauer H.D., de Heer K., Mitschke H.:
Orale Chenodesoxycholsäuretherapie und kolorektales Karzinom - eine experimentelle Studie.
Z. Gastroenterol. 17, 236-243, 1979

63. Shefer S., Zaki F.G., Salen G.:
Early morphologic and enzymatic changes in livers of
rats treated with chenodeoxycholic and ursodeoxycholic
acids.
Hepatology 3, 201-208, 1983
64. Sheikh Y.M., Daniel F.B., Witiak D.T., D'Ambrosio S.M.:
Metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.
Correlation of dihydrodiol and phenol metabolites with
organ susceptibility to carcinogenesis in Sprague-Dawley
and Long-Evans rats.
Drug Metab. Dispos. 11, 158-163, 1983
65. Sher S.P.:
Mammary tumors in control rats:
Literature tabulation.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 22, 562-588, 1972
66. Silverman S.J., Andrews M.W.:
Bile acids: Co-mutagenic activity in the Salmonella-
mammalian-microsome mutagenicity test.
J. Natl. Cancer Inst. 59, 1557-1559, 1977
67. Stellaard F., Sackmann M., Sauerbruch D., Paumgartner G.:
Simultaneous determination of cholic-acid and chenodeoxy-
cholic-acid: Pool sizes and fractional turnover rates in
human serum using 13-C-labelled bile acids.
J. Lipid Res. 25, 1313-1319, 1984
68. Swaen G.J.V., van Heerde P.:
Tumors of the haematopoietic system
In: Turusov V.S. (Hrsg.):
Pathology of tumors of laboratory animals.
Vol. 1 Part 1
International agency for research on cancer, Lyon, 1973

69. Thomas C.:
Morphologie und Pathogenese der Mammatumoren bei der Ratte.
In: Grundmann E. (Hrsg.):
Handbuch der allgemeinen Pathologie VI/7 Geschwülste Tumors III.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975
70. Thomas D.B.:
Factors that promote the development of human breast cancer.
Environ. Health Perspect. 50, 209-218, 1983
71. Tinsley I.J., Bone J.F., Bubl E.C.:
The growth, reproduction, longevity and histopathology of rats fed gamma-irradiated carrots.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 16, 306-317, 1970
72. Torgersen O.:
Regional distribution of DMBA-induced mammary tumors in the rat.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A 83, 639-644, 1975
73. Warburton M.J., Mitchell D., Ormerod E.J., Rudland P.:
Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the resting, pregnant, lactating and involuting rat mammary gland.
J. Histochem. Cytochem. 30, 667-676, 1982
74. Weisburger J.H., Horn C.L.:
Human and laboratory studies on the causes and prevention of gastrointestinal cancer.
Scand. J. Gastroenterol. 19 Supplement 104, 15-26, 1984

75. Weitz H., Mayring K., Wiebecke B., Eder M.:
Cholezystektomie, Cholelithiasis und Dickdarmkarzinom.
Dtsch. Med. Wochenschr. 108, 53-57, 1983
76. Wellings S.R., Jensen H.M., Marcum R.G.:
An atlas of subgross pathology of the human breast with
special reference to possible precancerous lesions.
J. Natl. Cancer Inst. 55, 231-273, 1975
77. Welsch C.W., Aylsworth C.F.:
Enhancement of murine mammary tumorigenesis by feeding
high levels of dietary fat: A hormonal mechanism?
J. Natl. Cancer Inst. 70, 215-221, 1983
78. Werner B., de Heer K.:
Effects of cholecystectomy on colon carcinogenesis.
In: Grundmann E. (Hrsg.):
Cancer Campaign Vol. 2 Colon Cancer
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1978
79. Wiebecke B., Weiss M., Cullmann H.J., Frick A., Weitz H.:
Resorptive cocarcinogene Wirkung von Galle bei der DMH-
induzierten Entstehung von Darmtumoren der Ratte.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 67, 709, 1983
80. Wong T.-W., Warner N.E., Yang N.C.:
Acute necrosis of adrenal cortex and corpora lutea in-
duced by 7,12-dimethylbenzanthracene and its implica-
tion in carcinogenesis.
Cancer Res. 22, 1053-1057, 1962

81. Wynder E.L., Chan P., Cohen L., McCornack F., Hill P.:
Etiology and prevention of breast cancer.
In: Grundmann E., Beck L. (Hrsg.):
Cancer Campaign Vol. 1 : Early diagnosis of breast
cancer.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1978
82. Young S., Hallows R.G.:
Tumors of the mammary gland.
In: Turusov V.S. (Hrsg.):
Pathology of tumors in laboratory animals.
Vol. 1 Part 1
International agency for research on cancer, Lyon, 1973
83. Zwieten M.J. van:
The rat as animal model in breast cancer research.
Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1984

Herrn Prof. Dr. Eder danke ich für die Erlaubnis,
die Untersuchung an seinem Institut durchführen
zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Wiebecke danke ich für Überlassung
des Themas und geduldige Betreuung.

Herr Dr. Stellaard (II. Med. Klinik Großhadern) hat
freundlicherweise die blutchemischen Untersuchungen
vorgenommen,

Herr Dr. Schreiber (Institut für Statistik und Bio-
mathematik Großhadern) war bei der statistischen
Auswertung behilflich.

Frau Kirkpatrick danke ich für die Anfertigung der
histologischen Präparate,

Frau Tränkel für die sorgfältige Ausarbeitung des
Manuskripts.

LEBENS LAUF

NAME: Florian Philipp Georg Leitl
GEBURTSDATUM: 09.02.1955
GEBURTSORT: München
ELTERN: Dr.med. dent. Rudolf Leitl
Dr.phil. Ursula Leitl, geb. Zametzer
FAM.STAND: verheiratet seit Juli 1982
EHEFRAU: Gertrud Leitl, geb. Emlinger
Ärztin

SCHULBILDUNG:

1961 - 1965 . Grundschule in Gräfelfing
1965 - 1974 Humanistisches Karlsgymnasium, München

HOCHSCHULSTUDIUM DER HUMANMEDIZIN:

1974 - 1981 Studium der Human-Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

30.11.1981 Approbation als Arzt

01.01.1982 - 31.03.1983 Grundwehrdienst als Stabsarzt

Seit 01.04.1983 Assistent am Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

